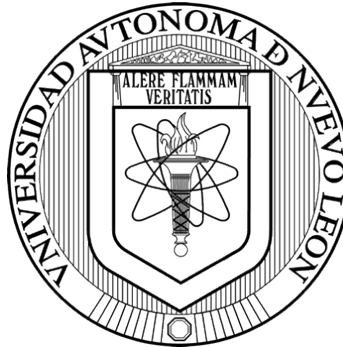


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTI-INFLAMATORIA DEL CALDO DE HUESO
EN UN MODELO MURINO DE COLITIS ULCERATIVA

POR

LBG. LAURA MARISOL MAR SOLÍS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

ENERO 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTI-INFLAMATORIA DEL CALDO DE HUESO
EN UN MODELO MURINO DE COLITIS ULCERATIVA

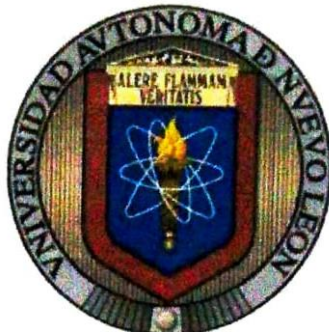
POR

LBG. LAURA MARISOL MAR SOLÍS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

ENERO 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTI-INFLAMATORIA DEL CALDO DE HUESO
EN UN MODELO MURINO DE COLITIS ULCERATIVA**

Aprobación de tesis por el comité particular de

LBG. Laura Marisol Mar Solís

Dirección de Tesis

Dr. Uziel Castillo Velázquez

Director

Ph.D. Luis Edgar Rodríguez Tovar

Co-Director

Dr. Humberto Rodríguez Rocha

Co-Director externo

Dr. Adolfo Soto-Domínguez

Co-Director

Dra. Aracely García García

Co-Director externo

Dr. Víctor Eustorgio Aguirre Arzola

Co-Director externo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto, para que pudiera obtener el grado de maestro en ciencias.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme ser parte de su programa de posgrado.

A mi director de tesis: Dr. Uziel Castillo Velázquez, por aceptarme en su equipo de trabajo. Agradezco el apoyo y los consejos que me dio para el proyecto, pero aún más cuando me escucho y ayudo en muchas cuestiones personales.

A mis asesores: Ph.D. Luis Edgar Rodríguez Tovar, Dr. Víctor Eustorgio Aguirre Arzola, Dr. Humberto Rodríguez Rocha, Dra. Aracely García García y Dr. Adolfo Soto Domínguez por sus comentarios y sugerencias las cuales me permitieron realizar correcciones en beneficio del proyecto.

Al Ph.D. Gerardo Méndez Zamora por la asesoría, revisiones y apoyo que me brindo durante diversas etapas de mi maestría, por motivarme a seguir y no darme por vencida. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba ser capaz. Especialmente por darme su amistad y apoyo en momentos difíciles.

Al Laboratorio de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina lugares donde lleve a cabo la parte experimental de proyecto, gracias a mis asesores por permitirme trabajar en ellos, apoyarme con los equipos y materiales necesarios.

A mis compañeros de laboratorio: Alicia Herrera, Fabiola Elizondo, Amisadai Cruz, Kevin Cárdenas, Carolina Elizondo, Jonás Barrera y Jenny Gonzales; gracias por toda la

ayuda que me brindaron y todos los momentos que vivimos. Les tengo un gran aprecio y cariño.

A Victoria Tapia, Alondra González y Daniela Huerta, llegaron en un momento muy difícil para mí, su compañía y apoyo me ayudaron a salir adelante, les estoy eternamente agradecida.

Al Laboratorio de Genética, Laboratorio de Toxicología, Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por permitirme utilizar algunos de los equipos que fueron necesarios para la realización de este proyecto.

A la Unidad de Formulación de Biológicos del Laboratorio de Inmunología y Virología perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas. Especialmente al Dr. Alonso Orozco, por ayudarme y apoyarme con equipos y técnicas fundamentales para el progreso del proyecto.

Al Laboratorio de Nutrición y Calidad de los Alimentos, especialmente al Dr. Hugo Bernal Barragán y a la Dra. Nydia Corina Vásquez Aguilar quienes me ayudaron y asesoraron en la obtención de algunos resultados de este proyecto. Por otra parte, agradezco a mi maestro el Dr. Hugo Bernal Barragán todo lo que aprendí de él, las palabras de aliento que siempre tuvo para mí.

Al Dr. Jorge Ramsy Kawas Garza y a las empresas AQUA Laboratorios y a MNA de México, S.A. de C.V., quienes me ayudaron en la obtención de algunos resultados que son presentados en este trabajo.

A la Fundación UANL y al Posgrado en Conjunto FA- FMVZ, por haberme apoyado económicamente para que pudiera presentar este proyecto en el congreso internacional “Nutrients 2019 - Nutritional Advances in the Prevention and Management of Chronic Disease”, llevado a cabo en Barcelona.

Finalmente quiero agradecer a mi familia: a mis padres Enrique Mar Cruz y Miriam Solís García, a mi hermana Miriam Lucia Mar Solís y mi novio Adrián Orlando Galván Quintero, por todo el amor y apoyo que me dan día con día. Son lo más importante en mi vida, los amo.

DEDICATORIA

A mi asesor:

Dr. Uziel Castillo Velázquez, por todo lo que me enseñó. Fue un honor trabajar con usted.

A mi familia:

Mamá, tú me haces sentir que soy capaz de lograr todo lo que me proponga y que no existen imposibles, me enseñaste a no rendirme jamás.

Papá, tu ejemplo a guiado mi vida, aprendí por ti a trabajar y esforzarme cada día, deje de ver obstáculos y me enfoque en ver oportunidades.

Hermana, desde niñas siempre te preocupaste en evitar que los demás me hicieran daño, me enseñaste a confiar en mí y no dejar que los comentarios de los demás me lastimaran.

Adrián, admiro tu esfuerzo y tenacidad por salir adelante. Gracias por apoyarme con ideas y consejos para el proyecto, por cuidarme y preocuparte por mí. Estoy muy orgullosa de ti y no tengo duda de que lograras grandes cosas.

A mi abuelo:

Luciano Solís Ortiz, Aunque falleciste hace varias semanas sigo recordando tú voz diciéndome solecito, gracias por haberme hecho tan feliz y siempre hacerme saber lo orgulloso que estabas de mí.

A mi amiga:

Alicia Herrera Gutiérrez, por haber compartido esta etapa conmigo. Gracias por escucharme, ayudarme, cuidarme, aconsejarme y consolarme siempre que necesite de ti.

A mis mentores:

Dr. Gilberto Jaramillo Rangel, Dra. Marta Ortega Martínez, Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta, Ph.D. Gerardo Méndez Zamora y la Dra. Diana Elia Caballero Hernández, por todos los consejos y ayuda que me han brindado a lo largo de estos años. Espero en un futuro llegar a ser tan buena como ustedes. Los quiero y aprecio mucho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Colitis Ulcerativa.	4
2.1.1. Epidemiología.....	5
2.1.2. Etiología.....	7
2.1.3. Patogénesis.....	7
2.1.4. Diagnostico.	8
2.1.5. Tratamiento.....	9
2.1.6. Impacto social.....	11
2.1.7. Impacto económico.	11
2.2. Nutrición y su asociación con la colitis ulcerativa.	12
2.3. Caldo de hueso.....	12
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo General	18
5.2. Objetivos Particulares.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Lugar de estudio.	19

6.2. Preparación del caldo de hueso.....	19
6.3. Determinación del contenido nutricional del caldo de hueso.	20
6.3.1. Proteína cruda.....	20
6.3.2. Aminoácidos.	21
6.3.3. Minerales.	21
6.4. Animales de experimentación.....	22
6.5. Aclimatación de los animales a condiciones de bioterio.....	22
6.6. Diseño experimental.	22
6.7. Inducción de la colitis experimental.	23
6.8. Tranquilización y sacrificio.	24
6.9. Toma de muestras.	24
6.10. Análisis Histológico.	25
6.11. Extracción de ARN.....	26
6.12. Síntesis de ADN complementario.....	26
6.13. Diseño de oligonucleótidos.....	27
6.14. Técnica de qPCR.	28
6.15. Análisis de datos.	29
7. RESULTADOS.....	30
7.1. Contenido nutricional del CH	30
7.2. Aporte nutricional de aminoácidos del CH.....	30
7.3. Aporte nutricional de minerales del CH.	31
7.4. Efecto del consumo de CH sobre la morfología del colon de ratones con CU. ...	33
7.5. Expresión génica de citocinas pro-inflamatorias en el colon de ratones con CU y tratados con CH.....	37
7.5.1. <i>Il-1β</i>	38

7.5.2. <i>Il-6</i>	38
7.5.3. <i>Tnf-α</i>	39
7.5.4. <i>Inf-γ</i>	39
7.6. Expresión génica de citocinas anti-inflamatorias en el colon de ratones con CU y tratados con CH.	40
7.6.1. <i>Il-4</i>	41
7.6.2. <i>Il-10</i>	41
7.7. Perfil de expresión génica de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el colon de ratones con CU y tratados con CH.	42
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES.....	48
10. BIBLIOGRAFÍA.....	49
11. ANEXOS	59
11.1. Dictamen del Comité Interno de Bienestar Animal en la Enseñanza e Investigación (CIBAEI).	59
11.2. Dictamen del Comité de Bioseguridad e Higiene (CBSH) de la FMVZ.	60
11.3. Técnica Histológica: Procesamiento de muestras.....	61
11.4. Tinción de Hematoxilina & Eosina.	62
11.4.1. Reactivos utilizados en la tinción de H&E.	63
11.5. Tinción de Ácido Peryódico de Schiff.....	65
11.5.1. Reactivos utilizados en la tinción de PAS.	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre los síntomas clínicos de la CU y la EC	5
Tabla 2. Características diagnosticas de la CU.	9
Tabla 3. Tratamientos empleados en la CU	10
Tabla 4. Animales empleados en los distintos grupos del estudio para evaluar el efecto del tratamiento profiláctico de CH en un modelo murino de CU.	23
Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por qPCR de los genes de interés y los números de acceso correspondientes de las secuencias utilizadas como base para su diseño.....	27
Tabla 6. Contenido nutricional del CH obtenido a partir de fémur de ganado bovino.	30
Tabla 7. Contenido de AA presentes en el CH obtenido a partir de fémur de ganado bovino.	31
Tabla 8. Cálculo del cociente de riesgos mediante la evaluación del aporte nutricional a la ingesta diaria de los minerales presentes en el CH.	32
Tabla 9. Procedimiento de deshidratación	61
Tabla 10. Desparafinación e Hidratación.....	61
Tabla 11. Pasos para la tinción de H&E	62
Tabla 12. Preparación Hematoxilina de Gill.....	63
Tabla 13. Preparación de la solución stock de Eosina.	63
Tabla 14. Preparación de la solución de alcohol-ácido.....	64
Tabla 15. Preparación de la solución de agua amoniaca.....	64
Tabla 16. Pasos para la tinción de PAS.....	65
Tabla 17. Preparación de la solución acuosa de Ac. Peryódico al 0.5%.....	66
Tabla 18. Preparación de la solución enjuagadura sulfurosa.	66
Tabla 19. Preparación de la solución de metabisulfito de sodio.	66
Tabla 20. Preparación de la solución de Ac. Clorhídrico al 1N.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia mundial de la CU	6
Figura 2. Factores implicados en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal	7
Figura 3. Línea del tiempo de los procedimientos realizados a los animales para llevar a cabo la evaluación del efecto anti-inflamatorio del CH en un modelo murino de CU.....	23
Figura 4. Evaluación de los tratamientos empleados sobre la morfología del colon empleando la tinción de H&E.....	34
Figura 5. Evaluación de los tratamientos empleados sobre la morfología del colon empleando la tinción de PAS.....	36
Figura 6. Efecto de la inducción de CU en la expresión de citocinas pro-inflamatorias ($2^{\Delta\Delta Ct}$) bajo los diferentes tratamientos.....	37
Figura 7. Efecto de la inducción de CU en la expresión de citocinas anti-inflamatorias ($2^{\Delta\Delta Ct}$) bajo los diferentes tratamientos.....	40
Figura 8. Perfil de expresión genética de citocinas de los grupos evaluados.	42

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
AAE	Aminoácidos Esenciales
AANE	Aminoácidos No Esenciales
AcOH	Ácido Acético
Ad Libitum	Libre Acceso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN Complementario
Ala	Alanina
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Arg	Arginina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN Mensajero
Asp	Acido Aspártico
Ca	Calcio
CBSH	Comité de Bioseguridad e Higiene
CH	Caldo de Hueso
CIBAEI	Comité Interno de Bienestar Animal en la Enseñanza e Investigación
Co	Cobalto
CT	Ciclo Umbral
Cu	Cobre
CU	Colitis Ulcerativa
Cys	Cisteína
DEPC	Pirocarbonato de Dietilo
DI	Dosis Ingerida
dNTP's	Deoxinucleósidos Trifosfatos
DR	Dosis Recomendada
EC	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
Fe	Hierro

GC	Grupo Control
Glu	Acido Glutámico
Gly	Glicina
<i>Gpd-1</i>	Glicerol-3-Fosfato Deshidrogenasa Uno
His	Histidina
HR	Cociente de Riesgo
<i>Il-10</i>	Interleucina diez
<i>Il-1β</i>	Interleucina uno-beta
<i>Il-4</i>	Interleucina cuatro
<i>Il-6</i>	Interleucina seis
Ile	Isoleucina
<i>Inf-γ</i>	Interferón gamma
K	Potasio
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Mg	Magnesio
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
N ₂	Nitrógeno
Na	Sodio
NaCl	Solución Salina Isotónica
Oligo(Dt)	Oligonucleótidos de Timina
P	Fosforo
PAS	Ácido Peryódico de Shiff
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA	Paraformaldehído
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
qPCR	PCR Cuantitativa

Ser	Serina
Thr	Treonina
TNBS	2,4,6-Ácido Trinitrobenceno-Sulfónico
<i>Tnf-α</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Zn	Zinc
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Glu	Glutamina
Asn	Asparagina
Trp	Triptofano

RESUMEN

El caldo de hueso (CH) ha sido utilizado durante muchos años para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, debido a las propiedades anti-inflamatorias que le son atribuidas a causa de su alto contenido de nutrientes. Por lo cual el presente estudio tuvo como objetivo determinar el contenido nutricional del CH y analizar su efecto anti-inflamatorio en un modelo murino de Colitis Ulcerativa (CU). El CH fue preparado a partir fémur de ganado bovino sometido a cocción durante 8 horas a 100°C. La determinación del contenido nutrimental se llevó a cabo empleando el método de Dumas (determinación de proteína), cromatografía líquida de alta resolución (determinación de aminoácidos), y espectrofotometría de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (determinación de minerales). Encontrando que cada 100 ml de CH contenía 25.01 mg de minerales y 248.51 mg de proteína de los cuales 231.86 mg corresponden a aminoácidos. Para la evaluación de las propiedades anti-inflamatorias del CH se emplearon 24 ratones macho de la cepa BALB/c que fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (n=12), el primer grupo recibió agua purificada, mientras que el segundo recibió CH, ambos tratamientos fueron administrados *ad libitum* durante 10 días posteriormente fueron eutanasiados 6 ratones de cada grupo, mientras que a los 6 animales restantes de cada grupo se les realizó la inducción de CU mediante la administración intrarectal de 2 mg de 2,4,6-ácido trinitrobenceno-sulfónico (TNBS) disuelto en ácido acético al 4% (AcOH), transcurridas 24 h los animales fueron eutanasiados. Después del sacrificio fueron colectadas muestras de colon de todos los grupos para realizar un análisis morfológico y determinar los niveles de expresión relativa de citocinas pro-inflamatorias (*Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf- α* y *Inf- γ*) y anti-inflamatorias (*Il-4* y *Il-10*) empleando la técnica de reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR). Donde se observó que la administración de CH como tratamiento profiláctico disminuyó el daño causado por la inoculación intrarectal de TNBS y AcOH, modulando la respuesta inmunológica al reducir de manera significativa la expresión de citocinas pro-inflamatorias y aumentando la expresión de citocinas anti-inflamatorias. En conjunto, estos resultados indican que el CH podría ser un tratamiento eficiente y de bajo costo para el manejo de la CU.

ABSTRACT

Bone broth (BB) has been used for a long time in the prevention and treatment of many diseases due to its anti-inflammatory properties that are attributed to its high nutrient content. Therefore, the current study was conducted to evaluate the nutritional composition of BB and their anti-inflammatory effect in a murine model of Ulcerative Colitis (UC). The BB was prepared by boiling bovine femur for 8 hours at 100°C. The determination of the nutritional content was carried out using the Dumas method (protein determination), high performance liquid chromatography (amino acids determination) and inductively coupled plasma optical emission spectrophotometry (minerals determination). Results showed that 100 ml of BB contain 25.01 mg of minerals and 248 mg of protein that provides 231.86 mg of amino acids. For the analysis of the anti-inflammatory activity of BB we used 24 male mice of the BALB/c strain that were randomly divided into two groups (n=12), the first group received purified water and the second group BB, both treatments were administered *ad libitum* for 10 days, subsequently, 6 mice from each group were sacrificed and the other six animal of each group were induced UC by an intrarectally administration of 2 mg of 2,4,6-trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS) dissolved in 4% acetic acid (AcOH), mouse were euthanized 24 h after colitis induction. After the mice were killed the colon of each mouse were isolated to perform a morphological analysis and determine the relative expression levels of pro-inflammatory (*Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf- α* and *Inf- γ*) and anti-inflammatory (*Il-4* y *Il-10*) cytokines using the technique of the polymerase chain reaction (PCR) in real time (qPCR). It was found that prophylactic administration of BB reduced the damage caused by the intrarectal administration of TNBS and AcOH and modulated the immune response by decreasing the expression of pro-inflammatory cytokines and increasing the expression of anti-inflammatory cytokines. The results obtained suggest that BB could be an efficient and low-cost alternative for the treatment of UC.

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) engloba una variedad de trastornos crónicos inflamatorios que afectan el tracto gastrointestinal de forma intermitente (Liu et al., 2017; Shi et al., 2010). Los más comunes son la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerativa (CU) (Tian et al., 2016).

La EC y la CU presentan una sintomatología similar: Diarrea crónica, dolor abdominal, presencia de sangre en las heces, astenia, anemia, fiebre (Liu et al., 2017; Vidal-Lletjós et al., 2017). Aunque ambas enfermedades son similares en cuanto a sintomatología pueden ser diferenciadas por la región del tubo digestivo donde se localiza la inflamación, complementando estos hallazgos con el análisis histológico (Dolz, 2008). En la EC los procesos inflamatorios pueden presentarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal, generalmente se presenta en la región terminal del íleon y la región perianal, afectando la pared del tubo digestivo extendiéndose hasta la capa serosa de este, formando abscesos y fistulas (Liu et al., 2017; Xavier & Podolsky, 2007). La CU, que es el objeto de esta tesis, afecta estrictamente la mucosa del intestino grueso y recto (Tian et al., 2016).

El diagnóstico de estas enfermedades se realiza mediante la evaluación del historial médico, sintomatología, análisis clínicos, colonoscopia, biopsias, histología y radiografías; La colonoscopia es un procedimiento clave para el diagnóstico de la enfermedad, dificulta el establecimiento de un diagnóstico temprano. (Van Assche et al., 2010). La edad promedio en la cual se establece el diagnóstico de la CU es a los 27 años, aunque la enfermedad suele presentarse entre los 15 y 35 años (Dolz, 2008; Xavier & Podolsky, 2007).

Actualmente se desconocen las causas que llevan al desarrollo de la enfermedad, pero se sospecha que está influenciado por factores genéticos: mutaciones asociadas a los genes NOD2/CARD15, TLR4 e IL-23R; inmunológicos: asociados a la integridad de la mucosa intestinal, expresión de citocinas y factores de transcripción; y ambientales: alimentación, tabaquismo, consumo de medicamentos tales como antiinflamatorios, anticonceptivos y desarrollo de infecciones bacterianas (Munyaka et al., 2016). Lo que

dificulta el establecimiento de un tratamiento efectivo para combatir la enfermedad, el tratamiento típico se basa en la administración por periodos prolongados de antiinflamatorios e inmunosupresores, los cuales son caros, presentan un bajo grado de efectividad y diversos efectos adversos (Iacucci & Ghosh, 2011; Papi et al., 2013).

En los últimos años se ha demostrado que las terapias basadas en un enfoque nutricional son efectivas para el tratamiento de enfermedades crónicas (Shlisky et al., 2017). Las personas que presentan CU tienen altos requerimientos de energía, debido al proceso inflamatorio que desarrollan, aunado a la disminución de la ingesta diaria lo que conlleva a una desnutrición (Vidal-Lletjós et al., 2017). Esto es de importancia en las enfermedades gastrointestinales, debido a que durante los periodos de desnutrición se reduce la producción de anticuerpos, lo que favorece el sobre crecimiento de bacterias, e inhibe la regeneración de la mucosa intestinal (Blanco-Rodríguez, 2014; Geerling et al., 1998).

Estudios realizados en modelos murinos de colitis han demostrado que la suplementación con aminoácidos y minerales puede ayudar a la recuperación del tracto gastrointestinal (Bertrand et al., 2013; Liu et al., 2017; Tsune et al., 2003; Vidal-Lletjós et al., 2017; Zhang et al., 2015). Una limitante para estos tratamientos es el alto costo de los suplementos basados en minerales y aminoácidos puros, por lo cual no son una alternativa rentable (Elia et al., 2016). Por lo cual se han buscado alimentos que aporten una amplia variedad de minerales.

Entre los alimentos que aportan una gran cantidad de nutrientes se encuentra el caldo de hueso (CH). Se ha reportado que mediante la cocción de larga duración de huesos es posible la obtención de una gran cantidad de aminoácidos, minerales y proteínas como el colágeno (Choi et al., 2016; Hsu et al., 2017; Kim et al., 2017; Monro et al., 2013; Seol et al., 2016). Las propiedades terapéuticas de este alimento no han sido completamente estudiadas mediante métodos científicos, pero en países como Mongolia se consume con el propósito de estimular el sistema inmune y favorecer el correcto funcionamiento del sistema digestivo, siendo estas propiedades terapéuticas atribuidas a su contenido nutricional (Chimegee & Dashmaa, 2018; Choi et al., 2016; Kim et al., 2017).

Actualmente no existen estudios que evalúen el efecto terapéutico del CH en la CU. Por ello el presente trabajo tuvo como propósito evaluar la capacidad terapéutica del CH en un modelo murino de CU. Los efectos fueron evaluados a nivel histológico y molecular para la cuantificación de citocinas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Colitis Ulcerativa.

La CU es una enfermedad crónica, idiopática y recidivante del tracto gastrointestinal, junto con la EC forma parte del grupo de patologías conocidas como EII (Tian et al., 2016). La primera descripción de lo que se conoce hoy en día como CU fue realizada en 1859 por Samuel Wilkis, quien detallo el caso de una mujer de 42 años que falleció después de presentar durante varios meses diarrea y fiebre, la autopsia de rutina revelo la presencia de úlceras e inflamación en la mucosa y submucosa del colon (Kirsner, 2001).

La CU se caracteriza por causar una inflamación continua en la capa mucosa y submucosa principalmente del colon y recto (Feuerstein & Cheifetz, 2014), mientras que en la EC causa una inflamación que se extiende desde la capa mucosa hasta la serosa en cualquier región del tracto gastrointestinal de forma discontinua, pero generalmente se ha identificado en la región terminal del íleon y la región perianal (Xavier & Podolsky, 2007).

Los síntomas clínicos característicos de la CU incluyen pérdida de peso, diarrea, sangrado rectal, dolor abdominal, desnutrición, falta de apetito, pérdida de electrolitos, deposiciones frecuentes y presencia de moco en las heces (Tabla 1) (Alok, 2013; Sánchez-Calvo, 2013). Entre el 25 y 70% de los pacientes con EII presentan síntomas en otros órganos. Entre las manifestaciones extraintestinales más comunes se encuentran las artropatías inflamatorias y la colangitis esclerosante primaria que es diagnosticado aproximadamente en el 2 – 10% de los pacientes con CU. Otras manifestaciones extra intestinales se presentan en la piel, como el eritema nudoso y el pioderma gangrenoso, en los ojos se presenta epiescleritis y uveítis, y en los huesos se presenta osteoporosis (Conrad et al., 2014).

Tabla 1. Comparación entre los síntomas clínicos de la CU y la EC (Head & Jurenka, 2003).

Signos /Síntomas	CU	EC
Área del tracto gastrointestinal afectada	Capa mucosa y submucosa del colon y recto.	Capa serosa de cualquier parte del tracto gastrointestinal, principalmente la región terminal del íleon y la región perianal.
Presentación de la lesión	Se presenta una lesión continua.	Se presentan lesiones en varias partes del tracto gastrointestinal, es decir es una lesión discontinua.
Diarrea	Aproximadamente 4 episodios al día.	Aproximadamente 4 episodios al día.
Dolor y calambres abdominales	Dolor abdominal leve, moderada presencia de calambres abdominales.	Dolor abdominal que puede ir de moderado a severo en el cuadrante interior derecho.
Sangre en heces	La mayoría de los afectados presentan sangrado rectal, este depende de la severidad de la enfermedad.	Algunos pacientes presentan sangrado rectal, esto depende de la severidad de la enfermedad.
Fatiga	Esta se presenta a causa de la pérdida de sangre y al desarrollo de anemia.	Esta se presenta a causa de la pérdida de sangre y al desarrollo de anemia.
Examinación física	El examen rectal muestra irritación en la región perianal, fisuras, hemorroides, fistulas y abscesos.	Inflamación peritoneal, abdominal o pélvica.

2.1.1. Epidemiología.

Entre los países con mayor incidencia de CU se encuentran Europa del norte, Reino Unido, América del norte y Australia, mientras que los de menor incidencia son Europa del este, Asia, Croacia y Corea del Sur (Figura 1) (Ananthakrishnan, 2015). En México, un estudio reportó que la incidencia de CU ha ido en aumento de 28 a 78 casos por cada 100,000 habitantes en el periodo de 1987 a 2006, siendo estos los datos más actuales con los que se cuenta (Yamamoto-Furusho, 2009).

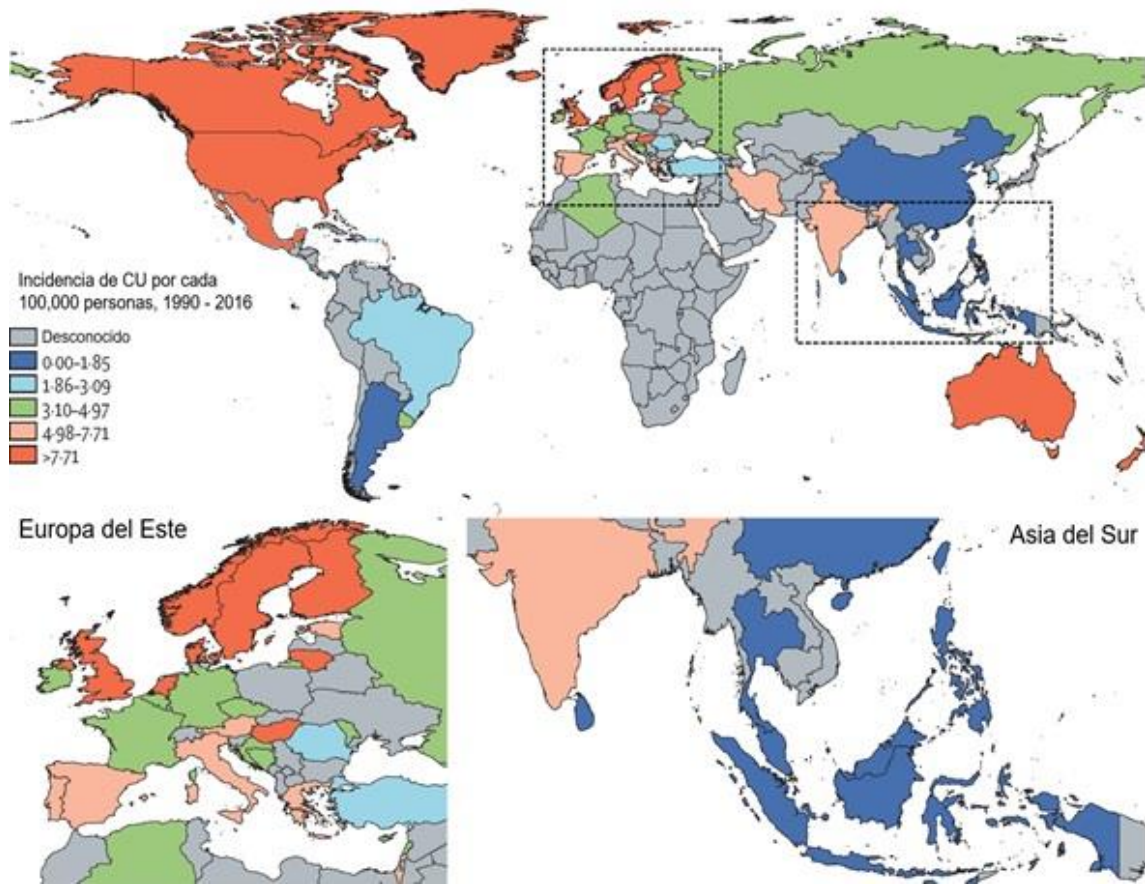


Figura 1. Incidencia mundial de la CU (Ng et al., 2017).

Se estima que aproximadamente 3 millones de personas sufren de CU alrededor del mundo (Bueno-Hernández et al., 2015). Aunque la edad promedio de incidencia de la enfermedad se presenta generalmente es entre los 25 y 34 años, algunos estudios han revelado que existe un segundo pico de incidencia entre los 60 y 70 años (Bernstein et al., 2006). Siendo este un dato de gran importancia para el pronóstico de la CU, las personas que presentan un inicio a temprana edad de la enfermedad generalmente tienen una evolución más rápida y severa de los síntomas causados por esta, considerando que entre el 7-20% de los afectados son niños y entre el 60-80% son adultos jóvenes (Prelipcean et al., 2013). No existe evidencia que la enfermedad tenga una predisposición por un sexo determinado, es decir que afecta por igual a hombres y mujeres (Head & Jurenka, 2003).

2.1.2. Etiología.

Se desconocen las causas que llevan al desarrollo de la EII, pero se cree que se debe a una compleja interacción entre la susceptibilidad genética, variaciones en la microbiota gastrointestinal, factores ambientales e inmunológicos (Figura 2) (Munyaka et al., 2016).

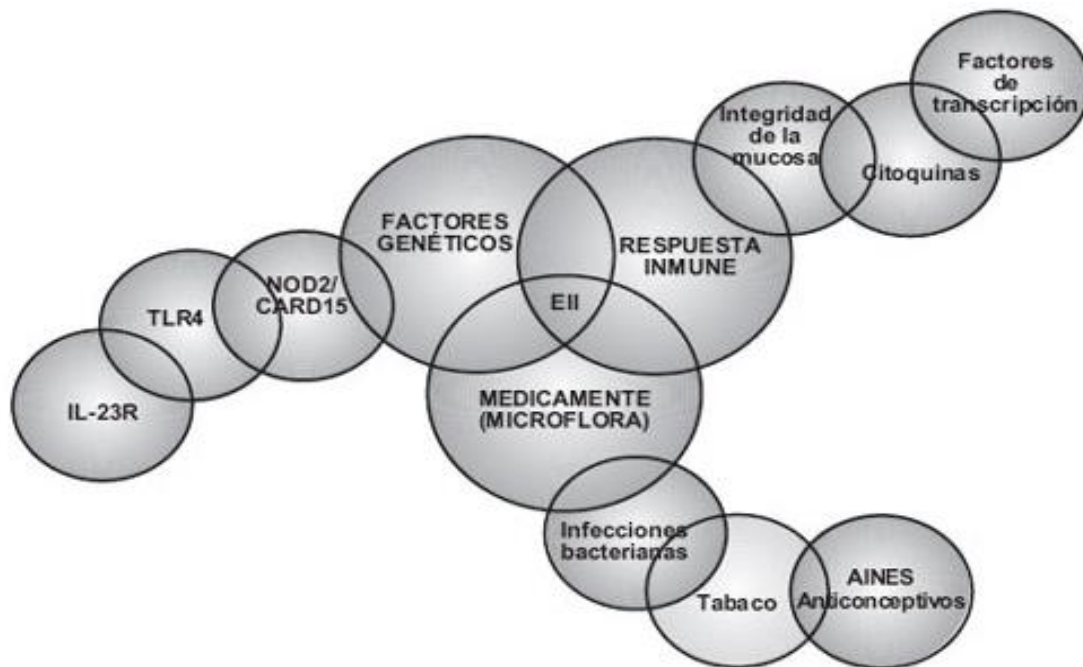


Figura 2. Factores implicados en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal (Sepúlveda et al., 2008)

2.1.3. Patogénesis.

La CU es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de daños en el epitelio del colon y recto, alteraciones en la respuesta inmune, reclutamiento de leucocitos y alteración de la microbiota del colon. Se cree que la enfermedad se desencadena por la disminución en la producción de mucina por parte de las células caliciformes y pérdida de las uniones estrechas entre los enterocitos, lo que permite la adsorción de una mayor cantidad de antígenos luminales. En la lámina propia de la mucosa se genera un mayor número de células dendríticas activadas y maduras que expresan una gran cantidad de receptores tipo Toll (TLR-2 y TLR-4) (Lynch & Hsu, 2018). Por otro lado, la disregulación de la respuesta inmune determina el inicio, la severidad y perpetuación de

la CU (Tatiya-aphiradee et al., 2018), Durante la colitis ulcerativa se observa un aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias las cuales son responsables de las lesiones en la mucosa y el daño tisular del colon, las citocinas pro-inflamatorias identificadas en la CU son TNF- α , IL-1- β , IL-6 e INF- γ (Filipescu et al., 2018). Aunque el organismo cuenta con mecanismos que ayudan a contrarrestar la inflamación, como es la secreción de citocinas anti-inflamatorias: IL-4 e IL-10, la expresión de estas es casi nula durante los periodos de actividad de la enfermedad (Xiong et al., 2013).

La CU y la EC son trastornos inflamatorios muy similares, el fenotipo de estas enfermedades es determinado por la variación de los factores de susceptibilidad, por lo cual las dos enfermedades pueden ser diferenciadas de acuerdo con la región del tracto gastrointestinal donde se encuentran las lesiones, si la inflamación abarca solamente la capa mucosa o si llega hasta la capa serosa (Roberts-Thomson et al., 2019). A nivel histológico, se pueden observar infiltración de linfocitos, células plasmáticas y granulocitos en la mucosa del colon de un paciente con CU, esto aunado a la pérdida de células caliciformes, ulceraciones y distorsión de las criptas de la mucosa (Lynch & Hsu, 2018).

2.1.4. Diagnostico.

La CU es una enfermedad difícil de diagnosticar e incurable, debido a que tiene una alta tasa de exacerbación y recurrencia, por lo cual los afectados requieren de un seguimiento ambulatorio durante 10-20 años, en los casos más severos el seguimiento se realiza durante toda la vida del paciente (Prelipcean et al., 2013). Cabe destacar que el seguimiento es necesario debido a que las personas que sufren CU tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer de colon (Zhang et al., 2015).

El diagnóstico de estas enfermedades se realiza mediante la evaluación del historial médico, sintomatología, análisis clínicos, colonoscopia, biopsias, histología y radiografías (Tabla 2) (Van Assche et al., 2010).

Tabla 2. Características diagnosticas de la CU (Conrad et al., 2014).

Evaluación	Características
Características clínicas (Presentes por más de 4 semanas)	<ul style="list-style-type: none"> • Diarrea • Sangrado rectal grave u oculto • Dolor abdominal durante o tiempo después de la defecación • Exclusión de infecciones intestinales: <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>, <i>Yersinia</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>E. coli</i> 0157:H7 y <i>Clostridium difficile</i>
Análisis clínicos	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia por deficiencia de hierro • Trombocitosis • Hipoalbuminemia • Autoanticuerpos: antiglutamato decarboxilasa (GAD), anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) (atípico o perinuclear) • Calprotectina fecal elevada
Características endoscópicas	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida del patrón vascular visible • Pérdida de pliegues haustrales • Erosión de la mucosa intestinal, sangrado espontaneo y ulceración • Apariencia edematosa y eritematosa de la mucosa • Pseudopólipos colónicos • Exudado mucopurulento
Características histológicas	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento de la inflamación mononuclear en la lámina propia (plasmocitosis) • Deficiencia de mucina • Deficiencia de células caliciformes • Distorsión de las criptas, ramificación y atrofia • Presencia de abscesos en las criptas

2.1.5. Tratamiento.

El tratamiento de la CU es complicado debido a que los afectados tienen una respuesta terapéutica variable durante el curso de la enfermedad (Prelipcean et al., 2013). Actualmente no se cuenta con tratamientos efectivos (Iacucci & Ghosh, 2011; Papi et al., 2013) el tratamiento farmacológico frecuentemente recetado es la Mesalazina

(Sehgal et al. 2018). Algunos de los tratamientos utilizados en diversas etapas de la CU son presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos empleados en la CU

Fármacos	Mecanismo de acción	Uso recomendado
Aminosalicilatos: Mesalazina Sulfasalazina (Sehgal et al. 2018)	Disminuye la inflamación, mediante el aumento de la expresión de receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR) en las células epiteliales del tracto gastrointestinal, además inhibe las enzimas COX, lo que afecta las prostaglandinas y lleva a la desinflamación del colon.	Para brotes leves o moderados y como tratamiento para el mantenimiento de la remisión
Corticosteroides: Prednisona Prednisolona Metilprednisolona Beclometasona Hidrocortisona Budesónida (Salice et al. 2019)	Anti-inflmatorios que actúan a través del receptor de glucocorticoides de las células inmunes y activan la señal de apoptosis de las células inflamatorias y de los linfocitos activados. Reducen la infiltración de células inflamatorias a través de la disminución de la vasodilatación y permeabilidad vascular	Para el tratamiento de brotes por un periodo corto
Inmunomoduladores: Tiopurinas: Azatioprina y 6-Mercaptopurina Inhibidor calcineurina: Ciclosporina (Hiraoka et al., 2012)	Tiopurinas: Inhibición de la síntesis de ADN y ARN, además induce la apoptosis de los linfocitos T Inhibidores de calcineurina: evitan la expansión de los linfocitos T.	En casos de CU graves que no han respondido al tratamiento con aminosalicilatos, tratamiento de mantenimiento en los periodos de remisión
Biológicos: Adalimumab Infliximab (Rutgeerts et al., 2005)	Efecto anti-inflamatorio, induce la apoptosis de las células inflamatorias, inhibiendo la señalización de TNF	Tratamiento de brotes graves y para el mantenimiento de la remisión de la enfermedad en pacientes que no responden a inmunosupresores

2.1.6. Impacto social.

Aunque la CU no es una enfermedad considerada como fatal, si lo son las complicaciones que surgen a raíz de esta como lo es la desnutrición, anemia y cáncer colorrectal (Cucino & Sonnenberg, 2001; Bernstein et al., 2001). En comparación con otras enfermedades crónicas como la migraña y el asma, los pacientes con CU presentan una mayor preocupación por las complicaciones de la enfermedad, esto aunado a depresión (Rubin et al., 2010). Esto debido a que la CU se presenta principalmente durante la tercera década de vida, siendo esta edad cuando por lo general las personas se desarrollan profesionalmente, comienzan una familia, por lo cual las preocupaciones ligadas a la enfermedad pueden causar la pérdida de oportunidades personales y profesionales importantes para los pacientes (Calvet et al., 2018).

2.1.7. Impacto económico.

Como se mencionó anteriormente Europa es el país con mayor incidencia de CU, los costos directos e indirectos relacionados con esta enfermedad rondan entre los 12.5 y 29.1 millones de euros al año, más del 50% de esta cifra se debe que los pacientes no cuentan con un trabajo remunerado debido a la incapacidad que genera la enfermedad, por lo cual se genera la baja por enfermedad de sus empleos, lo que obliga a las empresas a pagar una jubilación anticipada a los afectados (Calvet et al., 2018).

En Estados Unidos los costos directos de atención médica para pacientes que presentan la EII superan los 6 mil millones de dólares al año. En Canadá se calcula que anualmente se destinan 395 millones de dólares para la atención médica de estos padecimientos (Coward et al., 2015).

Los costos de atención médica para CU por paciente oscilan entre 6,217 y 11,477 dólares al año en Estados Unidos, mientras que en Europa es alrededor de 8,949 y 10,395 euros al año, donde las hospitalizaciones representan entre el 41 y 55% de los costos, mientras que el resto es destinado a los diversos tratamientos farmacológicos utilizados (Null et al., 2017). Se desconoce los costos de atención médica que tiene la CU en México.

2.2. Nutrición y su asociación con la colitis ulcerativa.

La dieta actual a nivel mundial implica un alto consumo de carne roja procesada, productos lácteos con alta concentración de grasas, granos refinados, el consumo de agua se ha visto desplazado por el predominio de bebidas carbonatadas con alto contenido de azúcar, siendo deficiente en el consumo de productos naturales como frutas, verduras, legumbres y pescado, lo cual ha sido asociado como un desencadenante para el desarrollo de la EII, aunado al estilo de vida industrializado donde se ven altos niveles de estrés (Haskey & Gibson, 2017).

Durante los periodos de desnutrición se reduce la producción de anticuerpos, las vellosidades del intestino se atrofian, se da pie al sobrecrecimiento bacteriano lo que ocasiona una reducción de la digestión y absorción de nutrientes (Blanco-Rodríguez, 2014).

La desnutrición proteico-energética y la deficiencia de micronutrientes son características comunes de los pacientes que sufren alguno de los tipos de EII, esto puede inhibir la regeneración de la mucosa intestinal, además de llevar a la depleción de la capacidad antioxidante de la mucosa (Geerling et al., 1998; Jonas & Ziegler, 1999).

2.3. Caldo de hueso.

En el 2016, la producción de ganado bovino en México fue de 7 millones de cabezas (USDA-FAS, 2016), donde aproximadamente el 20% del peso vivo del animal corresponde a tejido óseo (Afolayan et al., 2002). El tejido óseo es el principal producto de desecho generado por la industria cárnica. Sin embargo, los huesos contienen una alta cantidad de nutrientes como minerales, aminoácidos y proteínas que pueden ser aprovechados (Malmberg & Nygren, 2008). Un ejemplo de su aprovechamiento consiste en su transformación en harinas que son incorporadas a la dieta del ganado porcino como un suplemento rico en minerales (Ramos-Carrillo, 2010), o su utilización en la elaboración de CH (Choi et al., 2016; Hsu et al., 2017; Monro et al., 2013; Seol et al., 2016).

Podemos definir el CH como el líquido obtenido a partir de la cocción de huesos de animales, la cocción puede durar de 8 a 24 horas a una temperatura que va desde los

85 hasta los 100 °C (Chotechuang et al., 2018) la cocción de larga duración a fuego lento permite obtener una mayor cantidad de nutrientes como lo son los minerales y aminoácidos a los que se atribuyen propiedades curativas, cabe destacar que la mayor cantidad de nutrientes encontrados en el CH corresponde a aminoácidos (Chimegee & Dashmaa, 2018).

La composición nutrimental del CH varía de acuerdo a los diversos protocolos de preparación que existen, como lo es el origen de los huesos, el tipo de hueso utilizado, el tiempo y temperatura de cocción, la adición de ingredientes que faciliten la extracción de nutrientes, como lo es la utilización de vinagre y finalmente los procesos involucrados con el destino final del producto, por ejemplo, la liofilización (Alcock et al., 2019). El CH obtenido a partir de huesos de pollo y de ganado bovino son los más consumidos a nivel mundial (Chimegee & Dashmaa, 2018; Chotechuang et al., 2018).

El CH forma parte de la dieta diaria de países como Francia, España, Japón, China, Tailandia, Corea y Mongolia (Chotechuang et al., 2018; Kim et al., 2014). El CH es utilizado como base para la preparación de alimentos: la cocción de vegetales, carne, pastas, etc. (Chotechuang et al., 2018).

En Mongolia se cree que CH estimula el sistema inmune y favorecer el correcto funcionamiento del sistema digestivo, siendo estas propiedades terapéuticas atribuidas a su contenido nutricional (Chimegee & Dashmaa, 2018; Choi et al., 2016; Kim et al., 2017). Aunque no existes investigaciones que comprueben el efecto terapéutico que se le atribuye a este alimento, si existen diversas investigaciones que han determinado el contenido nutricional del CH (Chimegee & Dashmaa, 2018; Choi et al., 2016; Choi et al., 2017; Chotechuang et al., 2018; Hsu et al., 2017; Kim et al., 2014; Kim et al., 2017; Seol et al., 2016).

Debido al contenido nutricional del CH es que en los últimos años se ha utilizado como parte del tratamiento de pacientes con síndrome del intestino y la psicología (GAPS) (Hsu et al., 2017), la cual es una condición en la que se cree que existe una conexión entre las funciones digestivas y las del cerebro, entre estas enfermedades se encuentran: esquizofrenia, autismo, déficit de atención e hiperactividad (TDA/TDAH), la base para la utilización del CH como tratamiento complementario a estas enfermedades es debido a

que los pacientes presentan problemas digestivos, alergias y anormalidades en el sistema inmune, los cuales son atribuidos a deficiencias nutrimentales (Campbell-McBride, 2008), entre otras propiedades terapéuticas atribuidas al CH se encuentra la prevención de fracturas óseas y artritis (Kim et al., 2017), además de estimular el metabolismo de la glucosa (Mizokami et al., 2016), propiedades que son atribuidas a la presencia de proteínas como el colágeno y la osteocalcina.

El antecedente más relevante que apoya la hipótesis de que el CH puede ser utilizado para la prevención y tratamiento de la CU viene de un estudio realizado *in vitro* donde se evaluó la capacidad del caldo de pollo para inhibir la migración de neutrófilos. Los resultados de este estudio revelaron que el caldo de pollo es capaz de inhibir significativamente la migración de neutrófilos, pero además que esto es una variable dependiente de la concentración a la que se encuentre el caldo, es decir entre más diluido se encontraba el caldo menor era su efectividad inhibitoria, además de atribuir este resultado a los nutrientes presentes en el caldo. El principio de este estudio radica en que existen diversos agentes infecciosos que pueden desencadenar los síntomas de un resfriado, independientemente de cuál sea el agente infeccioso causante, todos conducen a la producción de citocinas proinflamatorias, las cuales están implicadas en la quimiotaxis y en la activación de los distintos tipos celulares que participan en la inflamación, entre los que destacan los neutrófilos los cuales son capaces de producir potentes secretagogos, responsables de la tos y de la producción de esputo, por lo cual al inhibir la migración de neutrófilos a la mucosa del tracto respiratorio se busca reducir el proceso inflamatorio (Rennard et al., 2000).

En México la dieta promedio está basada en el consumo de caldo elaborado a partir de carne de res o pollo, acompañado de huesos y algunas verduras, el cual es sometido a cocción durante 1 a 3 horas a 100 °C (Méndez et al., 2005). Al igual que en el CH el principal aporte nutricional del caldo tradicional preparado en México es de aminoácidos. El caldo de res aporta aproximadamente 5.9789 mg de aminoácidos por cada 100 ml (Méndez et al., 2005) mientras que el CH elaborado con huesos de ganado bovino aporta 83.15 mg de aminoácidos esenciales por cada 100 ml (Chimegee & Dashmaa, 2018). Tomando como referencia la actividad anti-inflamatoria del caldo de pollo y el aporte

nutricional del caldo de res, se espera que el CH también tenga un efecto anti-inflamatorio, por su alto contenido en aminoácidos.

Los aminoácidos son muy importantes para el mantenimiento de la integridad de la mucosa y para el correcto funcionamiento de la función de barrera, además de ser precursores para la síntesis de proteínas, a partir de los aminoácidos se sintetizan macromoléculas esenciales que llevan a cabo la curación de las heridas presentes en el intestino y son los principales sustratos energéticos de los enterocitos (Liu et al., 2017). Debido a la función que tienen los aminoácidos en el intestino, es de esperarse que al haber una deficiencia de alguno se produzca un daño en la mucosa intestinal, siendo esto lo que pasa en la CU (Wang et al., 2009). En el CH destacan una gran cantidad de aminoácidos, lo cual sugiere que gran parte del efecto terapéutico que se ha observado en diversas patologías se deba a la composición nutrimental del CH.

3. JUSTIFICACIÓN

La CU es un problema de salud que afecta gravemente la calidad de vida de adultos jóvenes. El interés social por esta enfermedad ha aumentado en los últimos años, porque al no conocerse las causas de esta enfermedad, se dificulta el desarrollo de tratamientos efectivos. Sin embargo, el tratamiento típico para esta enfermedad se basa en la administración por largos periodos de antiinflamatorios e inmunosupresores. Los medicamentos son caros y presentan un bajo grado de efectividad, por lo que no son capaces de lograr la recuperación del intestino grueso. Se ha observado que las deficiencias nutricionales agravan los problemas intestinales. Diversos investigadores proponen que la nutrición tiene un papel importante en la prevención y tratamiento de la enfermedad, por lo cual se han desarrollado terapias alternativas basadas en la suplementación de diversos aminoácidos y/o minerales. Los suplementos basados en aminoácidos o minerales generalmente son caros, por lo que no son una alternativa rentable, por lo tanto, es necesario que sean investigados subproductos de origen animal que tienen un alto contenido de estos nutrientes. Entre los alimentos que aportan una gran cantidad de nutrientes se encuentra el CH, ya que tiene una alta concentración de aminoácidos esenciales y no esenciales, minerales y proteínas. El CH debido a su contenido nutricional podría ser un tratamiento eficiente y de bajo costo para el manejo de la CU.

4. HIPÓTESIS

El CH tiene un efecto anti-inflamatorio en la mucosa del intestino grueso de ratones BALB/C que presentan CU inducida experimentalmente.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar el contenido nutricional del CH y analizar su efecto anti-inflamatorio en un modelo murino de CU inducido mediante 2,4,6-ácido trinitrobenceno-sulfónico (TNBS) y ácido acético (AcOH)

5.2. Objetivos Particulares

1. Estandarizar la técnica para la obtención de CH a partir de fémur de bovino y determinación de su contenido nutricional.
2. Valorar el efecto del CH en un modelo murino de CU mediante técnicas histológicas.
3. Evaluar el efecto anti-inflamatorio del CH en un modelo murino de CU a partir de la determinación de los niveles de expresión de diversas citocinas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Lugar de estudio.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), en conjunto con el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina (FA). Instituciones pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

6.2. Preparación del caldo de hueso.

El CH fue preparado a partir de fémur de ganado bovino, obtenido de manera comercial de la cadena de carnicerías SuKarne. Los huesos fueron cortados de forma transversal, obteniendo piezas con un peso de 100 a 130 g, esto fue realizado con el objetivo de aumentar el área de contacto durante la cocción y exponer la medula ósea, para obtener una mayor extracción de nutrientes (Hsu et al., 2017).

Se eliminaron manualmente las impurezas y restos visibles de carne de los huesos (Choi et al., 2016; Kim et al., 2014). Para realizar el lavado de los huesos, se calentó 1 L de agua en un vaso de precipitado hasta llegar a 50°C, posteriormente el agua fue vertida en una charola de aluminio de 30 cm de largo x 26 cm de ancho x 7 cm de alto, donde fueron colocados los huesos y se dejaron reposar durante 15 min, transcurrido este tiempo el agua fue descartada, el procedimiento de lavado se realizó tres veces con el propósito de eliminar todos los restos de carne, grasa y sangre presentes en los huesos (Kim et al., 2017).

Para llevar a cabo la preparación del CH se utilizó agua destilada, en una proporción 1:4 con respecto al peso de los huesos utilizados, por cada litro de agua utilizada se adicionaron 20 ml de vinagre de mesa, con el propósito de acidificar la preparación, condición que permite la extracción de una mayor cantidad de nutrientes de los huesos (Hsu et al., 2017). La preparación se llevó a cabo en una olla de cocción lenta (Taurus, México), donde se vertió el agua y fue llevada a punto de ebullición (100 °C) posteriormente se incorporaron los huesos previamente lavados (Hsu et al., 2017; Kim et

al., 2017; Choi et al., 2016). La cocción se mantuvo durante 8 horas continuas a 100 °C, adicionando de manera eventual agua destilada acidificada con vinagre de mesa, para mantener el volumen inicial de la preparación (Hsu et al., 2017).

Al concluir el proceso de cocción, el caldo se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 3 horas, para después ser refrigerado a 4°C durante 6 horas. El caldo fue filtrado utilizando un embudo al cual se le colocó una gasa de algodón, esto con el propósito de retirar los huesos y el exceso de grasa resultante del proceso de cocción. Finalmente, el caldo fue almacenado en botellas de polietileno con capacidad de 1 L a -20°C para su posterior utilización, cada botella fue llenada a un volumen máximo de 600 ml.

El proceso anteriormente descrito fue realizado por triplicado, obteniendo un volumen total de 6 litro de CH por replica.

6.3. Determinación del contenido nutricional del caldo de hueso.

6.3.1. Proteína cruda

El análisis de proteína cruda se realizó por el método de Dumas, empleando un analizador elemental por combustión TRUSPEC CHN (Leco Corp., St. Joseph. MI). Para la realización de este análisis fue necesario pasar la muestra a estado sólido, para lo cual se liofilizó 1 L de caldo de hueso de cada una de las réplicas empleando un sistema de liofilización Freeze Dry System 7750020 (LABCONCO corp., Kansas City, MI) obteniendo así 3.33 g de muestra sólida por litro de caldo liofilizado. La determinación del contenido de proteína se realizó por triplicado, utilizándose 1 g de muestra de cada replica. El método de Dumas consistió en calentar la muestra liofilizada del caldo de hueso en presencia de óxido de cobre y un oxidante, hasta llegar a la temperatura de 850 °C, permitiendo así la liberación y cuantificación del nitrógeno total (N₂) presente en la muestra, tomando como base que las proteínas tienen un 16% de N₂ en su composición se estimó la cantidad de proteína presente en la muestra multiplicando la cantidad de N₂ total obtenida por el factor de conversión 6.25, el resultado obtenido de esta operación expreso el porcentaje de proteína cruda presente en la muestra (Etheridge et al., 1998). Este análisis fue realizado

por el Laboratorio de Nutrición y Calidad de los Alimentos de la Facultad de Agronomía, UANL

6.3.2. Aminoácidos.

La determinación de aminoácidos (AA) fue realizada por el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se determinó el contenido de ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), glicina (Gly), lisina (Lys), histidina (His), treonina (Thr), arginina (Arg), alanina (Ala), prolina (Pro), cisteína (Cys), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y fenilalanina (Phe) a partir de 1 g de liofilizado de cada una de las réplicas, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando el kit AccQ-Tag (Waters Cromatografía, S.A., Barcelona), el procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3.3. Minerales.

La determinación de minerales fue realizada por AQUA Laboratorios de acuerdo con el método oficial 2011.14 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC International, 2016). Este método se basa en la determinación de calcio (Ca), magnesio (Mg), fósforo (P), sodio (Na), potasio (K), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn), cobalto (Co) y molibdeno (Mo) mediante espectroscopia de emisión con plasma de acoplamiento inductivo. Los resultados fueron obtenidos a partir del análisis de 100 ml de muestra de cada una de las réplicas. Para evaluar los beneficios o riesgos asociados a la ingesta de metales presentes en el caldo de hueso se determinó el cociente de riesgos (Hazard ratio, HR), el cual consistió en determinar la cantidad de mg del mineral de interés consumidos (DI) en cada 100 ml de caldo (volumen máximo de ingesta diaria), los mg obtenidos fueron divididos entre la cantidad de mg recomendados de ingesta diaria del mineral de interés ($HR = (DI) \text{ dosis ingerida} / (DR) \text{ dosis recomendada}$), un valor de HR mayor a uno indica un aumento en la probabilidad de que la dosis ingerida de ese mineral cause un riesgo en la salud, por el contrario un valor de HR igual a uno o menor indica

que no hay riesgos asociados con el consumo de los minerales evaluados (Hsu et al., 2017).

6.4. Animales de experimentación.

Se emplearon 24 ratones macho de la cepa BALB/c libres de patógenos de 20 – 25 g de peso, de 8 semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Los animales fueron alojados en jaulas microventiladas, a una temperatura ambiental controlada de 22 ± 1 °C, con una humedad relativa de 40 – 60% y un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad (6 am – 6 pm).

El protocolo se realizó cumpliendo con los lineamientos estipulados en la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SENASICA). Además de atender las directrices establecidas por el Comité Interno de Bienestar Animal en la Enseñanza e Investigación (CIBAEI) y del Comité de Bioseguridad e Higiene (CBSH) de la FMVZ. La aprobación del proyecto por ambos comités quedo registrado en los dictámenes ID CIBAEI: 01/2019 e ID CBSH: 006 (Anexo 11.1 y 11.2), los documentos antes mencionados se encuentran disponibles en el departamento de posgrado de la FMVZ.

6.5. Aclimatación de los animales a condiciones de bioterio.

Todos los animales pasaron por un proceso de aclimatación de una semana, durante la cual fueron manejados diariamente por un periodo de 10 min por la persona encargada de su cuidado y manejo. Se mantuvo acceso restringido al bioterio, con el propósito de evitar que los animales sufrieran estrés. Durante el proceso de aclimatación se administró agua y alimento *ad libitum*, en un horario de 9 am a 10 am todos los días hasta la finalización del proyecto.

6.6. Diseño experimental.

Los 24 ratones fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (n=12) (Tabla 4). Los animales de ambos grupos recibieron la dieta estándar “Rodent lab chow 5001” de Purina, el primer grupo recibió agua purificada (grupo control, GC), mientras que el

segundo recibió CH, ambos tratamientos fueron administrados *ad libitum* durante 10 días. Durante este periodo se monitoreo diariamente el peso corporal, el consumo de alimento y agua de todos los animales utilizando una balanza digital marca Denver Instrument Company modelo XP-300 (Colorado, USA).

Tabla 4. Animales empleados en los distintos grupos del estudio para evaluar el efecto del tratamiento profiláctico de CH en un modelo murino de CU.

Profilaxis			
Agua purificada (n=12)		Caldo de hueso (n=12)	
GC pre-TNBS/ AcOH	GC post-TNBS/ AcOH	CH pre-TNBS/ AcOH	CH post-TNBS/ AcOH

Después de los 10 días de tratamiento profiláctico, fueron sacrificados 6 ratones de cada grupo con el propósito de evaluar el efecto del CH en animales sanos (GC pre-TNBS/ AcOH y CH pre-TNBS/ AcOH). El día 11 a los 6 animales restantes de cada grupo se les realizo la inducción experimental de CU utilizando 2,4,6-ácido trinitrobenceno-sulfónico (TNBS), disuelto en ácido acético al 4%(AcOH) (GC post-TNBS/ AcOH y CH post-TNBS/ AcOH) (Figura 3).

Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Procedimiento	Administración del tratamiento profiláctico										Sacrificio pre-inducción	Inducción de la lesión intestinal	Sacrificio post-inducción

Figura 3. Línea del tiempo de los procedimientos realizados a los animales para llevar a cabo la evaluación del efecto anti-inflamatorio del CH en un modelo murino de CU.

6.7. Inducción de la colitis experimental.

Para llevar a cabo la inducción de CU, los animales fueron mantenidos en un periodo de ayuno durante 24 horas (Cheng et al., 2006; Nivin-Huerta et al., 2013; Tomasello et al., 2015). Los animales fueron tranquilizados con un coctel de ketamina/xilacina a una dosis de 100 mg/kg – 10 mg/kg, la cual fue aplicada vía

intraperitoneal (Xu et al., 2007) y se procedió a realizar la administración rectal de 0.150 ml de una solución de 2 mg de TNBS, disuelto en AcOH al 4% (Cetinkaya et al., 2006). La instilación se realizó introduciendo un catéter plástico (1 mm de grosor) 3 cm desde el ano, posteriormente se aplicaron 0.150ml de aire, con el propósito de expandir la solución dentro del colon de los animales (Cetinkaya et al., 2006). Finalmente, los animales fueron sostenidos de manera vertical con la cabeza hacia abajo durante 5 minutos, para asegurar la distribución de la solución y evitar el retorno de esta (Weiss et al., 2015). Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la inducción.

6.8. Tranquilización y sacrificio.

Para llevar a cabo el sacrificio de los animales, primero fueron tranquilizados con un coctel de ketamina/xilacina a una dosis de 100 mg/kg – 10 mg/kg (Xu et al., 2007), posteriormente se realizó dislocación cervical (Bolant et al., 1990; Feldman & Gupta, 1976). Concordando esta metodología con los lineamientos establecidos en las Normas Mexicanas: NOM-033-SAG/ZOO-2014 y NOM-062-ZOO-1990 (SENASICA).

6.9. Toma de muestras.

Una vez sacrificados los animales, fueron inmovilizados en una tabla operatoria para animales pequeños. Para la toma de muestras, se realizó una apertura de la cavidad abdominal mediante una incisión subcostal bilateral. Se realizó una exploración macroscópica de toda la cavidad abdominal, con el objetivo de detectar anomalías. Con ayuda de un bisturí se extirpo el colon en su totalidad y se procedió a lavarlo con solución salina isotónica (NaCl 0.9%).

Por último, el colon se dividió en 2 fragmentos longitudinales, uno de los fragmentos se destinó para el estudio histológico y otro fue utilizado para cuantificar la expresión de citocinas mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los segmentos destinados para el análisis histológico fueron fijados mediante inmersión en una solución de paraformaldehído amortiguado al 4% (PFA), donde se mantuvieron durante 48 horas a temperatura ambiente, para continuar con los siguientes pasos de la técnica histológica.

Los segmentos destinados para el análisis molecular de citocinas fueron colocados en microtubos de 2 ml de capacidad (Eppendorf[®]) que contenían 500 µl del reactivo de lisis celular RNazol[®], Tiocianato de guanidina (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA), las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

6.10. Análisis Histológico.

Las muestras de colon previamente fijadas en PFA 4%, pasaron por un proceso de deshidratación. El proceso de deshidratación se llevó a cabo sumergiendo las muestras en alcoholes de graduación creciente (60, 70, 80, 96% y Absoluto) y finalmente se realizaron 3 cambios en alcohol absoluto. Una vez finalizado el proceso de deshidratación, las muestras fueron aclaradas mediante su inmersión en xilol, esto con el propósito de extraer el agente deshidratante, para finalmente realizar una inmersión en parafina caliente a 52°C. Cada una de las inmersiones se realizó por una hora. Finalmente se realizaron los bloques de parafina donde se encontrarán embebidos los tejidos, las muestras fueron orientadas de manera adecuada, con el propósito de obtener cortes longitudinales. Los bloques de parafina fueron seccionados en un microtomo obteniendo cortes de 5 µm de espesor. Los cortes fueron fijados en portaobjetos por medio de baño térmico. Una vez montados los cortes en los portaobjetos estos fueron sometidos nuevamente a un gradiente de alcoholes (Xilol, etanol absoluto, etanol 96%, etanol 70% y agua destilada) con el propósito de hidratar los cortes, para realizar la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E), la cual es una tinción de contraste que permitirá evaluar el efecto de los tratamientos en la morfología del colon de los ratones, además se realizó la tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS), técnica histoquímica utilizada para la identificación de componentes celulares ricos en hidratos de carbono, como lo son las células caliciformes productoras de una proteína altamente glicosilada llamada mucina, la cual lubrica y protege el epitelio intestinal. Finalmente, se aplicó una gota de resina Entellan, para montar los cubreobjetos. Los cortes histológicos fueron observados en un microscopio de luz (Nikon, Eclipse 50i, USA) a 10 X y 40 X para evidenciar y localizar lesiones, infiltración de neutrófilos, así como los cambios asociados al tratamiento sobre la morfología tisular. Los resultados fueron registrados utilizando el programa Q-capture Pro 7 (QIMAGING[®], USA).

6.11. Extracción de ARN.

La extracción de ácido ribonucleico total (ARN) de las muestras de colon se realizó a partir de las muestras suspendidas en el reactivo de lisis celular RNazol[®], Tiocianato de guanidina (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Los tejidos fueron homogenizados con el reactivo de lisis utilizando un homogeneizador de tejidos (Tissue-Tearor. Model 985370. BioSpec Products, Inc., USA), para posteriormente se realizó la extracción de ARN total siguiendo con las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el pellet de ARN total este fue suspendido en 20 µl de agua libre de nucleasas, obtenida mediante el tratamiento de esta con policarbonato de dietilo (DEPC). Finalmente, para evaluar el rendimiento obtenido de la extracción se efectuó la medida 260/280 por medio de un espectrofotómetro (EPOCH, BioTek, Canada), donde además se determinó la cantidad de ng/µl de ARN.

6.12. Síntesis de ADN complementario.

A partir del ARN total obtenido, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) usando el kit de transcripción reversa ImProm- II[™] Reverse Transcription System (PROMEGA[®], USA). En cada reacción se mezclaron 4 µl del buffer de reacción ImProm-II[™] 5X, 1 µl de la mezcla de dNTP's (0.5 mM de cada uno), 2.4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl del iniciador Oligo(dT)₁₅, 1 µl de la transcriptasa ImProm-II[™], 1500 ng del template de ARN y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en microtubos con capacidad de 200 µl (Eppendorf[®]). Cada tubo fue debidamente etiquetado con el número de muestra al que correspondían. Las muestras preparadas fueron incubadas en un termociclador modelo Veriti[®] (Applied Biosystems[®], USA) para llevar a cabo la síntesis de ADNc, las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes: 25 °C (5 minutos), 42 °C (60 minutos), 70°C (15 minutos) y 4 °C (∞). Una vez finalizada la retrotranscripción se determinó la concentración y pureza del ADNc obtenido por medio de un espectrofotómetro (EPOCH, BioTek, Canada). Finalmente, los productos obtenidos fueron almacenados a -20 °C hasta su posterior uso.

6.13. Diseño de oligonucleótidos.

El diseño de oligonucleótidos para la cuantificación de citocinas (*Il-1 β* , *Il-4*, *Il-6*, *Il-10*, *Tnf- α* e *Inf- γ*) y del gen endógeno (*Gpd-1*) se realizó a partir de la secuencia de ARNm de cada gen, obtenidas en el Genbank. (Tabla 5).

Se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación de las ocho secuencias seleccionadas, usando el programa en línea Primer-Quest Tool de la empresa Integrated DNA Technologies, Inc., encargada de realizar la síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este proyecto. Los oligonucleótidos fueron diseñados de acuerdo con las siguientes especificaciones: tamaño aproximado de 20 pb, temperatura de fusión de 60°C y un contenido de guanina-citocina del 55%. Los oligonucleótidos obtenidos fueron analizados mediante el programa PRIMER BLAST para verificar la especificidad de estos con la secuencia de interés.

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por qPCR de los genes de interés y los números de acceso correspondientes de las secuencias utilizadas como base para su diseño.

Gen	Genebank ID	Oligonucleótidos
		F(Sentido), R (Antisentido)
<i>Il-1β</i>	NM_008361.4	F: 5' GGT ACA TCA GCA CCT CAC AA -3' R: 5' TTA GAA ACA GTC CAG CCC ATAC -3'
<i>Il-4</i>	NM_021283.2	F: 5' TTG AGA GAG ATC ATC GGC ATT T -3' R: 5' CTC ACT CTC TGT GGT GTT CTT C -3'
<i>Il-6</i>	NM_031168.2	F: 5' CTT CCA TCC AGT TGC CTT CT -3' R: 5' CTC CGA CTT GTG AAG TGG TAT AG -3'
<i>Il-10</i>	NM_010548.2	F: 5' TTG AAT TCC CTG GGT GAG AAG -3' R: 5' TCC ACT GCC TTG CTC TTA TTT -3'
<i>Inf-γ</i>	NM_008337.4	F: 5' CTC TTC CTC ATG GCT GTT TCT -3' R: 5' TTC TTC CAC ATC TAT GCC ACT T -3'
<i>Gpd1</i>	NM_010271.3	F: 5' CCT ACT GCT GAC CTT TCT TCT C -3' R: 5' GCC CTG AGG ACG ATA AAC TAT AA -3'
<i>Tnf-a</i>	NM_013693.3	F: 5' TTG TCT ACT CCC AGG TTC TCT -3' R: 5' GAG GTT GAC TTT CTC CTG GTA TG -3'

6.14. Técnica de qPCR.

La cuantificación relativa de las secuencias de interés fue analizada mediante PCR cuantitativa (7500 Real Time PCR. System Applied Biosystem) usando el reactivo SYBR Green. La cuantificación de la expresión génica por qPCR fue calculada empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, el cual consistió en restar el C_t (ciclo umbral) del gen endógeno (Gpd1) al C_t del gen de interés, obteniendo así el ΔC_t , después se obtuvo el promedio ΔC_t del grupo control (GC pre-TNBS/ AcOH) y este fue restado al ΔC_t de cada una de las muestras biológicas calculando así el $\Delta\Delta C_t$, finalmente se aplicó la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. El C_t fue determinado usando la línea de base que por defecto es asignada por el sistema.

La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando el kit GoTaq qPCR Master Mix (PROMEGA[®], USA). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 μ l para cada muestra, donde 10 μ l eran del Mix GoTaq qPCR (2x), 1 μ l de la pareja de oligonucleótidos de interés los cuales se encontraban a una concentración de 100 μ M, 75 ng del ADNc de interés (1 μ l) y finalmente la reacción fue completada con 8 μ l de agua libre de nucleasas. Las reacciones de qPCR fueron llevadas a cabo en placas de 96 pocillos PCR[®] Microplate (Axygen Scientific[®], California, USA), cubiertas con film Platemax[®] UltraClear Sealing Film (Axygen Scientific[®], California, USA). Cada muestra fue colocada por triplicado en la placa, además de colocar una reacción control la cual consistió en agregar todos los reactivos utilizados para hacer la reacción de amplificación con excepción del ADNc.

Las condiciones de síntesis empleadas fueron las siguientes: un ciclo inicial a 50 °C durante 2 minutos, un ciclo de activación de la polimerasa a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización a 95°C por 15 s, una alineación de 60°C por 60 s y una extensión a 72°C por 45 s. Al finalizar el programa de síntesis se incrementó la temperatura de 60 a 95°C para crear una curva de disociación.

6.15. Análisis de datos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, Nueva York, EE. UU.). Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar. Los datos de expresión génica fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Para la generación de gráficos se empleó el programa GraphPad Prism 6.

7. RESULTADOS

7.1. Contenido nutricional del CH

En el presente trabajo, se determinó el contenido de proteínas, aminoácidos y minerales presentes en el CH obtenido a partir de la cocción de fémur de ganado bovino durante 8 horas continuas a 100 °C (Tabla 6). A partir de cada 100 ml de CH se obtuvieron 333 mg de muestra sólida, los presentes resultados muestran que de los sólidos presentes en el CH el 7.51 % pertenece a minerales, mientras que el 74.62 % corresponden a proteína, considerando que la importancia de la proteína consumida en la dieta se debe a su capacidad para aportar aminoácidos (AA), se determinó que el 69.92% de los sólidos presentes en el CH son AA.

Tabla 6. Contenido nutricional del CH obtenido a partir de fémur de ganado bovino.

Contenido nutricional	mg/ 100 ml
Proteína	248.5181
AA	232.8671
Minerales	25.0176

7.2. Aporte nutricional de aminoácidos del CH.

En la Tabla 7 se muestra el contenido de AA presentes en el CH obtenido a partir de fémur de ganado bovino, donde se analizaron 17 de los 20 AA que conforman las proteínas, esto debido a que para realizar la determinación de AA mediante HPLC se realiza una hidrólisis ácida la cual elimina el triptófano (Trp) de la muestra y convierte a la glutamina (Gln) a Glu y la asparagina (Asn) a Asp, por lo cual los valores reportados para Glu y Asp representan también el contenido de Gln y Asn.

Los presentes resultados muestran que cada 100 ml de CH aporta 232.8671 mg de AA, donde el 54.56% corresponde a aminoácidos esenciales (AAE) y el 44.43% a aminoácidos no esenciales (AANE). Los principales AA encontrados en el CH fueron Glu, His, Arg, Asp, Lys, Gly, Thr, y Val, los cuales se encuentran a una concentración superior a 14 mg/100 ml de CH, mientras que los de menor concentración fueron Ala y

Ile. El AAE encontrado en mayor abundancia fue His seguido de Arg y Lys (43.98, 17.28 y 15.08 mg/100 ml CH respectivamente). Los AANE encontrados en mayor abundancia fueron Glu, Asp y Gly (50.14, 16.74 y 15.01 mg/100 ml CH respectivamente).

Tabla 7. Contenido de AA presentes en el CH obtenido a partir de fémur de ganado bovino.

AA	mg/ 100 ml
Asp	16.7499
Glu	50.1499
Ser	6.8265
Gly	15.0183
Ala	2.5974
Pro	3.3966
Cys	3.4632
Tyr	5.2614
Lys	15.0849
His	43.9893
Thr	14.7519
Arg	17.2827
Val	14.1858
Met	9.2907
Ile	3.0969
Leu	4.6620
Phe	7.0596
Total AA	232.8671
AAE	129.4039
AANE	103.4632

7.3. Aporte nutricional de minerales del CH.

El contenido de minerales del CH obtenido a partir de fémur de ganado bovino es presentado en la Tabla 8. Los principales minerales encontrados en el CH fueron Na, Ca, P, K y Mg, estos se encontraron en cantidades superiores a 1 mg por cada 100 ml de CH, En cambio los minerales encontrados en menor concentración fueron Co y Mn (0.0022 y 0.0004 mg/100 ml CH). Además, se realizó el análisis para Molibdeno, el cual no pudo ser detectado debido a que la técnica es capaz de detectar minerales en una concentración

mínima de 0.0001 mg/100 ml, lo que nos indica que este mineral se encuentra en cantidades inferiores a esta.

Debido a que los huesos contienen algunos minerales que pueden ser tóxicos para el organismo dependiendo de la dosis a la cual se encuentren se calculó de cociente de riesgos (HR) tomando como base los mg de minerales presentes en 100 ml de CH y la ingesta diaria recomendada de los minerales analizados, obteniendo valores de HR menor a uno, lo que indica que no hay riesgos asociados con el consumo de alguno de los minerales evaluados (Tabla 8).

Tabla 8. Cálculo del cociente de riesgos mediante la evaluación del aporte nutricional a la ingesta diaria de los minerales presentes en el CH.

Minerales	mg/ 100 ml	Ingesta diaria recomendada (mg)	HR
Ca	6.4160	1000	0.0064
Mg	1.8460	400	0.0046
P	2.0370	1000	0.0020
Na	12.5840	2000	0.0063
K	1.9610	3800	0.0005
Fe	0.0430	18	0.0024
Cu	0.0310	1.7	0.0182
Zn	0.0970	14	0.0069
Mn	0.0022	5.5	0.0004
Co	0.0004	1.8	0.0002
Total	25.0176	8241	0.0030

7.4. Efecto del consumo de CH sobre la morfología del colon de ratones con CU.

Mediante la técnica histológica de rutina y la tinción de H&E se determinó que los animales que recibieron agua como tratamiento profiláctico y no se les realizó la inducción de colitis (GC pre-TNBS/ AcOH) a nivel de colon presentaban una arquitectura de apariencia normal, debido a que se observó un epitelio íntegro, una mucosa y submucosa conservada y criptas bien definidas (Figura 4-A). Además, las muestras fueron visualizadas a 100X para comprobar la ausencia de células inflamatorias y señales de hemorragia (Figura 4-B). Estos resultados fueron tomados como control negativo para determinar que los reactivos y la dosis utilizada para el establecimiento del modelo de colitis fueron efectivos. Los hallazgos obtenidos fueron utilizados como referencia para evaluar si el consumo de CH no genera cambios morfológicos en el colon. En la Figura 4-C y 4-D se observan los resultados obtenidos de los animales que recibieron CH como tratamiento profiláctico durante 10 días y no fueron sometidos al protocolo de inducción de colitis (CH pre-TNBS/ AcOH), se observa una arquitectura de apariencia normal, similar a la reportada para el control negativo. Estos resultados indican que el consumo de CH no genera daños morfológicos en colon.

En la Figura 4-E se muestran los resultados obtenidos de los animales que fueron sometidos a la inducción de CU mediante la administración rectal de 0.150 ml de una solución de 2 mg de TNBS, disuelto en AcOH al 4% y que recibieron como tratamiento profiláctico agua (GC post-TNBS/ AcOH), se observó una severa distorsión arquitectónica en el colon de estos animales, erosión del epitelio, distorsión de las criptas, así como la presencia de abundantes neutrófilos y eritrocitos (Figura 4-F). Estos resultados demuestran la efectividad del protocolo utilizado para el establecimiento del modelo de CU, por lo cual fueron considerados como controles positivos. Los hallazgos obtenidos fueron tomados como referencia para evaluar si el consumo de CH tiene un efecto protector contra el daño causado por la administración de TNBS y AcOH. En la Figura 4-G se observa que los animales tratados con CH previo a la inducción de CU (CH post-TNBS/ AcOH), presentaron un epitelio conservado, una moderada distorsión de las criptas y moderada presencia de eritrocitos y neutrófilos (Figura 4-H).

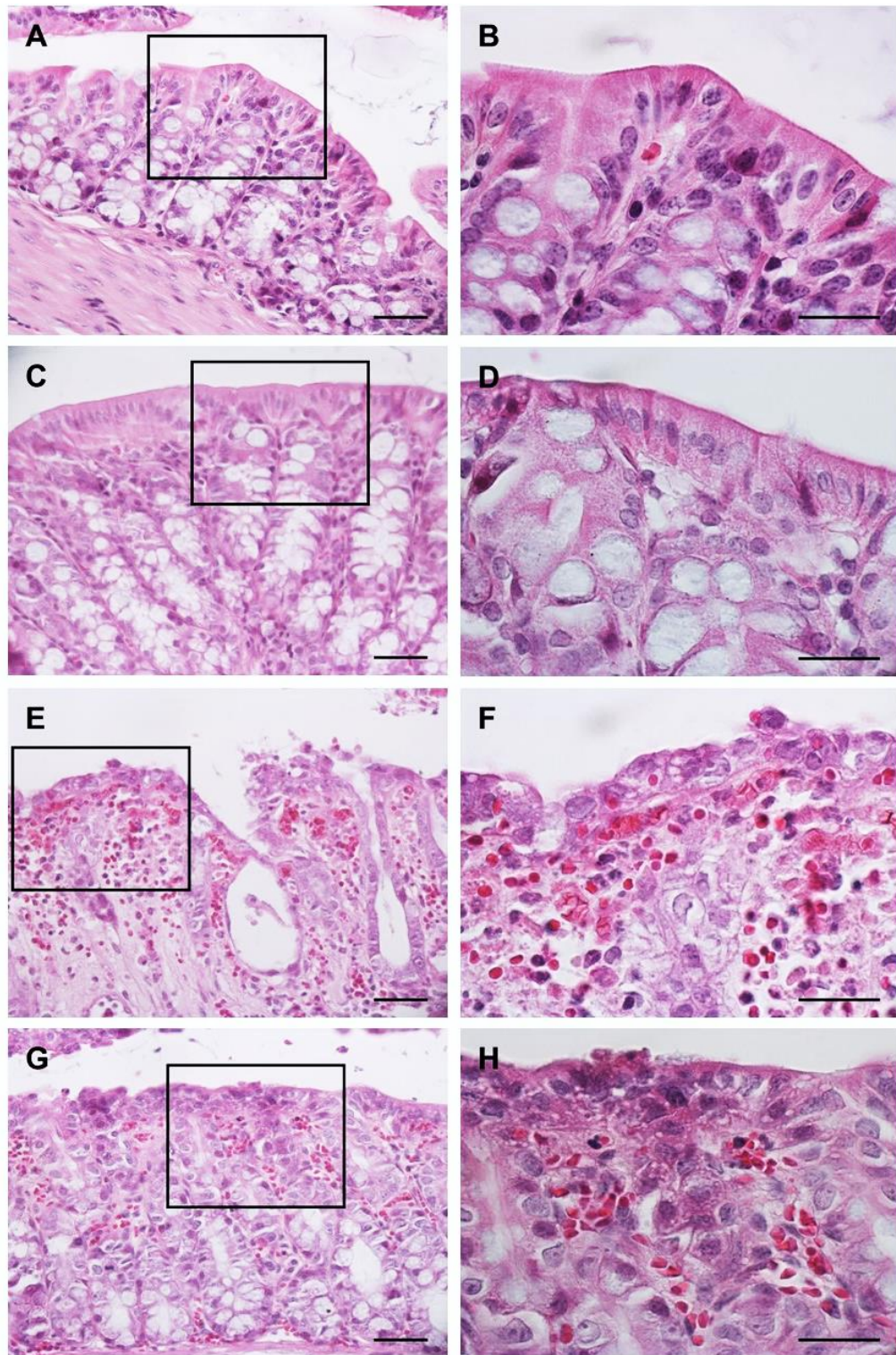


Figura 4. Evaluación de los tratamientos empleados sobre la morfología del colon empleando la tinción de H&E. Las imágenes: A, C, E, y G se encuentran a un aumento de 40X mientras que las imágenes B, D, F y H representan una amplificación a 100X de la región marcada dentro del rectángulo en las imágenes a 40X. La barra de escala se encuentra a 100 μ m en todas las imágenes.

El empleo de la técnica histoquímica PAS, ayudo a establecer la abundancia de células caliciformes las cuales muestran una coloración purpura/magenta, además, de determinar la integridad del epitelio en el borde apical de los enterocitos donde se encuentran las microvellosidades.

Los grupos a los cuales no se indujo la CU presentaron una distribución normal de células caliciformes, además de presentar una tinción positiva en el borde apical de los enterocitos, los resultados del grupo que recibió agua como tratamiento profiláctico se muestran en la Figura 5-A y 5-B (GC pre-TNBS/ AcOH), mientras que en la Figura 5-C y 5-D se muestran los resultados de los animales que recibieron CH (CH pre-TNBS/ AcOH).

La administración intrarectal de TNBS y AcOH redujo el número de células caliciformes y afecto la integridad del epitelio del colon. Los resultados de los animales que recibieron como tratamiento profiláctico agua previo a la inducción de la CU (GC post-TNBS/ AcOH) se muestran en las Figura 5-E y 5-F donde se observa una severa pérdida de células caliciformes y ausencia de tinción en la región apical de los enterocitos, lo cual es un indicativo de la pérdida de microvellosidades. En contraste con los resultados obtenidos en el control positivo, donde se observó que los animales que recibieron CH previo a la inducción (CH post-TNBS/ AcOH) mostraron una pérdida moderada de células caliciformes (Figura 5-G), algunas secciones del epitelio mostraron una leve tinción en la región apical de los enterocitos (Figura 5-H), lo cual podría ser un indicativo de la presencia de microvellosidades en esas regiones, aunque en menor proporción.

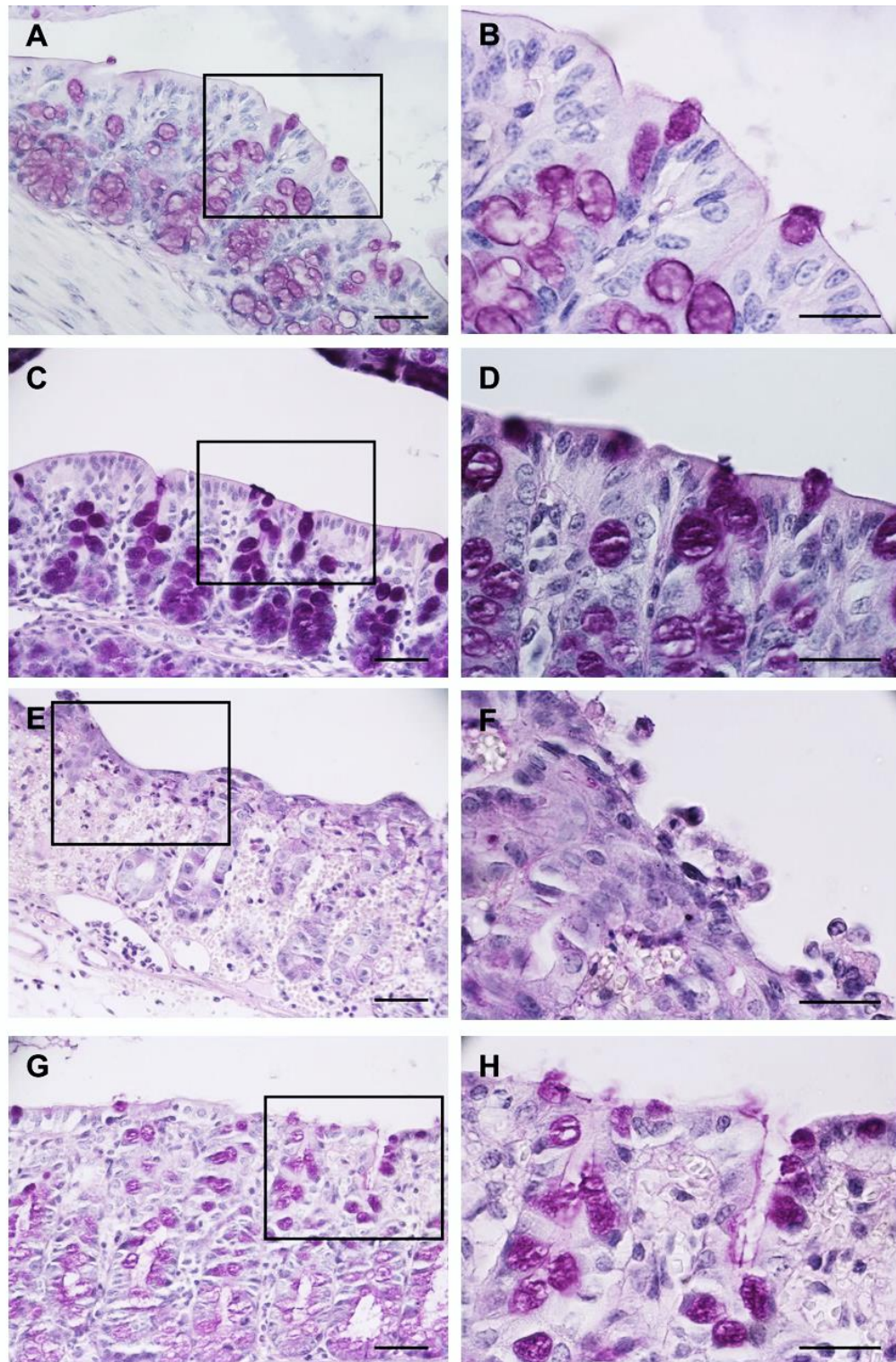


Figura 5. Evaluación de los tratamientos empleados sobre la morfología del colon empleando la tinción de PAS. Las imágenes: A, C, E, y G se encuentran a un aumento de 40X mientras que las imágenes B, D, F y H representan una amplificación a 100X de la región marcada dentro del rectángulo en las imágenes de 40X. La barra de escala se encuentra a 100 μ m en todas las imágenes.

7.5. Expresión génica de citocinas pro-inflamatorias en el colon de ratones con CU y tratados con CH.

Se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de las citocinas pro-inflamatorias: *Il-1 β* , *Il-6* ($p < 0.0001$) y *Tnf- α* ($p < 0.05$) en los animales a los cuales se les hizo la inducción de colitis y recibieron como tratamiento profiláctico agua (GC-post-TNBS/AcOH) en comparación con el grupo que recibió como tratamiento profiláctico CH y de los grupos controles. El nivel de expresión de *Inf- γ* ($p < 0.0001$) tuvo un aumento significativo en los grupos a los que se les realizó la inducción de colitis en comparación con los que no, sin embargo, los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de CH (CH-post-TNBS/AcOH) ($p < 0.05$) presentaron los niveles de expresión más altos (Figura 6).

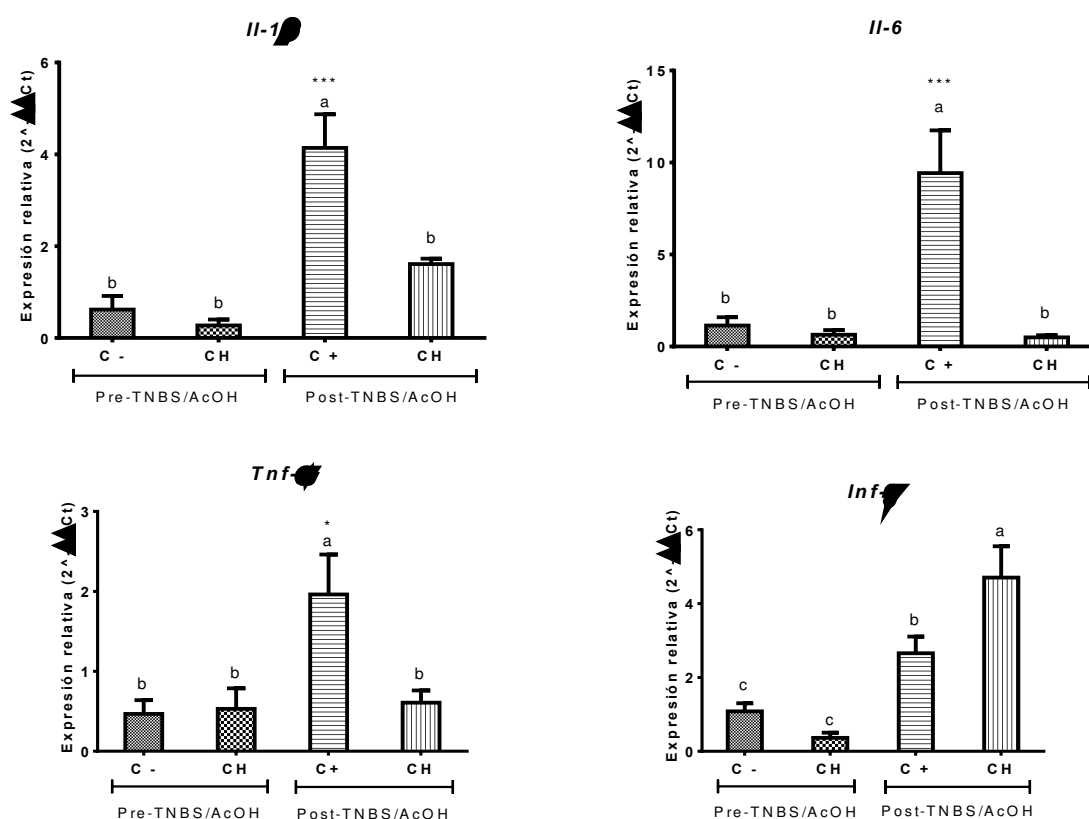


Figura 6. Efecto de la inducción de CU en la expresión de citocinas pro-inflamatorias (2^{-ΔΔCt}) bajo los diferentes tratamientos. Los datos se presentan como media de cada grupo, las barras indican el error estándar, mientras que las letras sobre cada columna indican las diferencias estadísticas.

7.5.1. *Il-1 β*

Los grupos que fueron sometidos a la inducción de colitis mediante la administración intrarectal de TNBS y AcOH presentaron una mayor expresión de *Il-1 β* . En los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de agua durante 10 días previos a la inducción de colitis se observó una expresión relativa de *Il-1 β* de 4.14 ± 0.73 (GC-postTNBS/AcOH), mientras que en los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de CH la expresión relativa fue de 1.61 ± 0.12 (CH-postTNBS/AcOH). Lo que indica que el tratamiento profiláctico de CH previene la expresión de *Il-1 β* en un 61.12% en aquellos animales a los que se les realizó la inducción de CU (CH-postTNBS/AcOH) con respecto a aquellos que recibieron agua como tratamiento profiláctico (GC-postTNBS/AcOH).

En los grupos que no fueron sometidos a la inducción de colitis, la expresión relativa de *Il-1 β* fue de 0.62 ± 0.30 en el grupo que recibió el tratamiento profiláctico agua (GC-preTNBS/AcOH), mientras que el grupo que recibió el tratamiento profiláctico de CH fue 0.27 ± 0.13 (CH-preTNBS/AcOH).

7.5.2. *Il-6*

En los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de agua durante 10 días previos a la inducción de colitis se observó una expresión relativa de *Il-6* de 9.43 ± 2.32 (GC-postTNBS/AcOH), mientras que en los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de CH la expresión relativa fue de 0.50 ± 0.12 (CH-postTNBS/AcOH). Lo que indica que el tratamiento profiláctico de CH previene la expresión de *Il-6* en un 94.70% en aquellos animales a los que se les realizó la inducción de CU (CH-postTNBS/AcOH) con respecto a aquellos que recibieron agua como tratamiento profiláctico (GC-postTNBS/AcOH).

En los grupos que no fueron sometidos a la inducción de colitis, la expresión relativa de *Il-6* fue de 1.14 ± 0.45 en el grupo que recibió el tratamiento profiláctico agua (GC-preTNBS/AcOH), mientras que el grupo que recibió el tratamiento profiláctico de CH fue de 0.64 ± 0.25 (CH-preTNBS/AcOH).

7.5.3. *Tnf- α*

En los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de agua durante 10 días previos a la inducción de colitis se observó una expresión relativa de *Tnf- α* de 1.96 ± 0.50 (GC-postTNBS/AcOH), mientras que en los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de CH la expresión relativa fue de 0.61 ± 0.14 (CH-postTNBS/AcOH). Lo que indica que el tratamiento profiláctico de CH previene la expresión de *Tnf- α* en un 68.88% en aquellos animales a los que se les realizó la inducción de CU (CH-postTNBS/AcOH) con respecto a aquellos que recibieron agua como tratamiento profiláctico (GC-postTNBS/AcOH).

En los grupos que no fueron sometidos a la inducción de colitis, la expresión relativa de *Tnf- α* fue de 0.47 ± 0.17 en el grupo que recibió el tratamiento profiláctico agua (GC-preTNBS/AcOH), mientras que el grupo que recibió el tratamiento profiláctico de CH fue de 0.53 ± 0.26 (CH-preTNBS/AcOH).

7.5.4. *Inf- γ*

En los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de agua durante 10 días previos a la inducción de colitis se observó una expresión relativa de *Inf- γ* de 2.66 ± 0.45 (GC-postTNBS/AcOH), mientras que en los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de CH la expresión relativa fue de 4.71 ± 0.85 (CH-postTNBS/AcOH). Lo que indica que los animales a los que se les realizó la inducción de CU y recibieron el tratamiento profiláctico de CH expresaron 77.06 % más *Inf- γ* (GC- postTNBS/AcOH) en comparación con aquellos que recibieron agua como tratamiento profiláctico (CH-postTNBS/AcOH).

En los grupos que no fueron sometidos a la inducción de colitis, la expresión relativa de *Inf- γ* fue de 1.08 ± 0.22 en el grupo que recibió el tratamiento profiláctico agua (GC-preTNBS/AcOH), mientras que el grupo que recibió el tratamiento profiláctico de CH fue de 0.37 ± 0.14 (CH-preTNBS/AcOH).

7.6. Expresión génica de citocinas anti-inflamatorias en el colon de ratones con CU y tratados con CH.

Se analizaron los niveles de expresión de las citocinas anti-inflamatorias: *Il-4* ($p < 0.0002$) e *Il-10* ($p < 0.0006$), con el objetivo de evaluar si el CH tiene un efecto anti-inflamatorio mediado por la expresión de estas citocinas. Se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de ambas citocinas en los animales a los cuales se les hizo la inducción de colitis y recibieron CH como tratamiento profiláctico (CH-postTNBS/AcOH) en comparación con el grupo que recibió tratamiento profiláctico de agua y de los grupos controles a los cuales no se les hizo inducción de colitis (Figura 7).

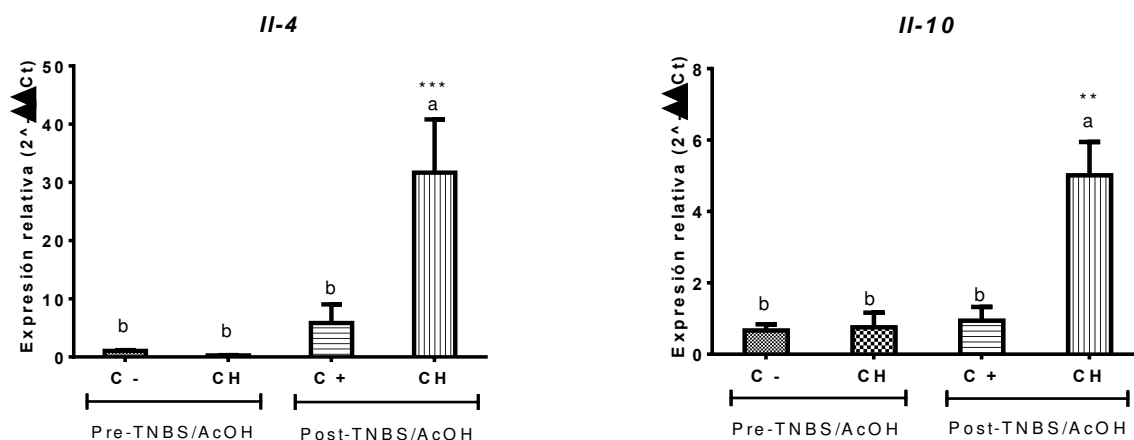


Figura 7. Efecto de la inducción de CU en la expresión de citocinas anti-inflamatorias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) bajo los diferentes tratamientos. Los datos se presentan como media de cada grupo, las barras indican el error estándar, mientras que las letras sobre cada columna indican las diferencias estadísticas.

7.6.1. *Il-4*

En los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de agua durante 10 días previos a la inducción de colitis se observó una expresión relativa de *Il-4* de 5.85 ± 3.20 (GC-postTNBS/AcOH), mientras que en los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de CH la expresión relativa fue de 31.67 ± 9.15 (CH-postTNBS/AcOH). Lo que indica que los animales a los que se les realizó la inducción de CU y recibieron el tratamiento profiláctico de CH expresaron 541.36 % más *Il-4* (CH- postTNBS/AcOH) en comparación con aquellos que recibieron agua como tratamiento profiláctico (GC-postTNBS/AcOH).

En los grupos que no fueron sometidos a la inducción de colitis, la expresión relativa de *Il-4* fue de 1.04 ± 0.13 en el grupo que recibió el tratamiento profiláctico agua (GC-preTNBS/AcOH), mientras que el grupo que recibió el tratamiento profiláctico de CH fue de 0.26 ± 0.05 (CH-preTNBS/AcOH).

7.6.2. *Il-10*

En los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de agua durante 10 días previos a la inducción de colitis se observó una expresión relativa de *Il-10* de 0.94 ± 0.39 (GC-postTNBS/AcOH), mientras que en los animales que recibieron el tratamiento profiláctico de CH la expresión relativa fue de 5.01 ± 9.15 (CH-postTNBS/AcOH). Lo que indica que los animales a los que se les realizó la inducción de CU y recibieron el tratamiento profiláctico de CH expresaron 531.97 % más *Il-10* (CH-postTNBS/AcOH) en comparación con aquellos que recibieron agua como tratamiento profiláctico (GC-postTNBS/AcOH).

En los grupos que no fueron sometidos a la inducción de colitis, la expresión relativa de *Il-10* fue de 0.67 ± 0.17 en el grupo que recibió el tratamiento profiláctico agua (GC-preTNBS/AcOH), mientras que el grupo que recibió el tratamiento profiláctico de CH fue de 0.76 ± 0.41 (CH-preTNBS/AcOH).

7.7. Perfil de expresión génica de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el colon de ratones con CU y tratados con CH.

En la Figura 8 se muestra el perfil de citocinas de cada uno de los tratamientos evaluados, se observa que la administración de CH previo a la inducción de CU tiene un efecto inmunomodulador, al disminuir la expresión de citocinas pro-inflamatorias y aumentando la expresión de citocinas anti-inflamatorias (CH-postTNBS/AcOH).

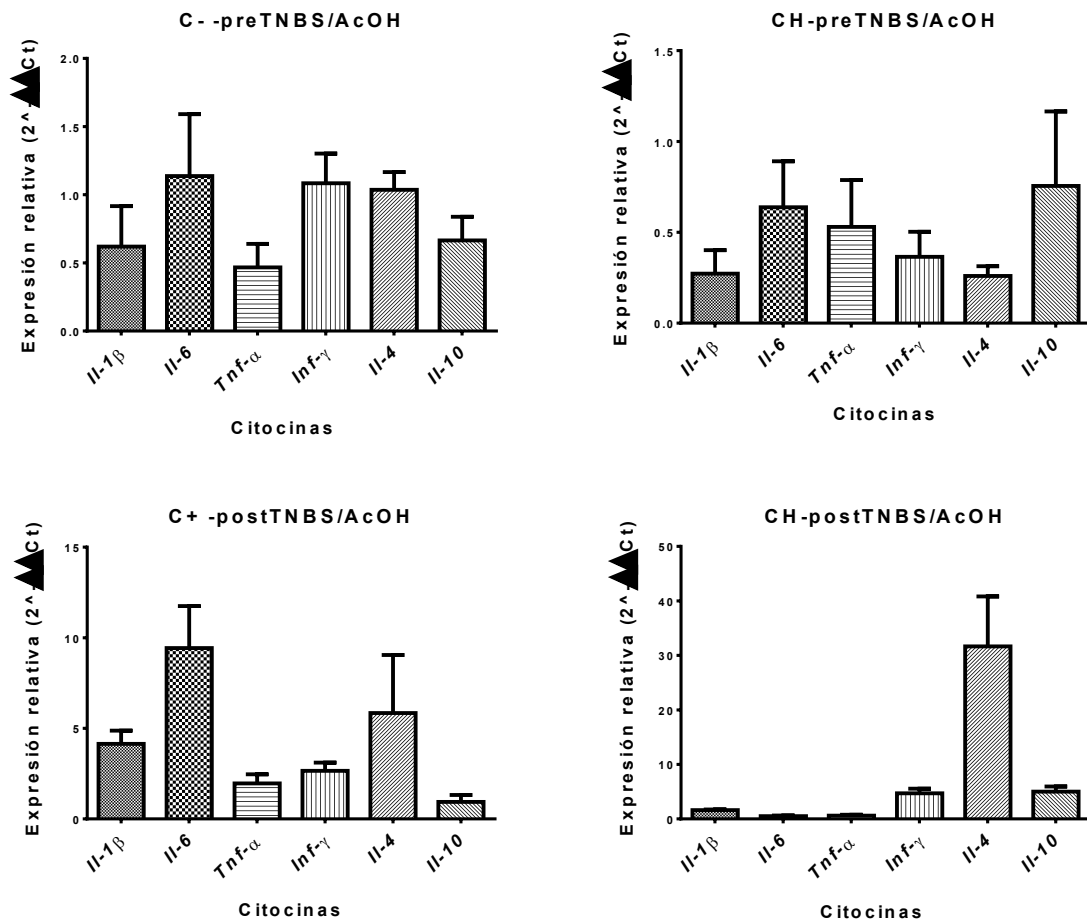


Figura 8. Perfil de expresión génica de citocinas de los grupos evaluados. Los datos se presentan como media de cada citocina, las barras indican el error estándar

8. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado que las deficiencias nutricionales en la dieta de los países industrializados es el principal factor de riesgos para el desarrollo de diversas enfermedades que afectan el tracto gastrointestinal (Chimegee & Dashmaa, 2018; Haskey & Gibson, 2017), como es el caso de la CU (Blanco-Rodríguez, 2014; Geerling et al., 1998; Shlisky et al., 2017).

Actualmente, los medicamentos utilizados para el tratamiento de esta enfermedad se basa en la administración de antiinflamatorios e inmunosupresores por largos periodos de tiempo, la desventaja de estos es que son caros y presentan un grado de efectividad bajo, con diversos efectos secundarios (Iacucci & Ghosh, 2011; Papi et al., 2013), a diferencia de las terapias basadas en un enfoque nutricional que han demostrado ser efectivas para el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas, sin causar efectos secundarios (Shlisky et al., 2017).

La inclusión en la dieta de alimentos que aporten un alto contenido en nutrientes como el CH podría ayudar a la prevención de la CU (Geerling et al., 1998; Jonas & Ziegler, 1999). Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio se ha enfocado en analizar dicho efecto en la prevención y tratamiento de enfermedades que tienen como desencadenante las deficiencias nutricionales.

El presente estudio, tuvo como propósito la identificación de los nutrientes presentes en el CH, ya que actualmente se cuenta con pocos estudios que reporten el contenido nutricional del CH, pero además el contenido nutricional varía de acuerdo a los diversos protocolos de preparación que son empleados, donde observamos diferencias en el tipo de huesos utilizados, el origen de los mismos, el tiempo y temperatura de cocción utilizados en la preparación, la adición de ingredientes que faciliten la extracción de nutrientes, como es el caso del vinagre y finalmente de los procesos involucrados con el destino final del producto, como por ejemplo la liofilización (Alcock et al., 2019).

En el presente trabajo se utilizaron huesos femorales (Adeyeye, 2014), tomando como base lo reportado por Górska-Warsewicz et al. (2018) quien menciona que los productos de origen animal como lo es la carne y productos derivados como los huesos y

la medula ósea son la principal fuente de nutrientes en la dieta. Además, Hassan et al., (2012) reportó que la medula ósea aporta más nutrientes de los que aporta la carne. Lo cual se relaciona con lo reportado por Méndez et al., (2005) donde encontraron que el caldo obtenido a partir de carne de res aporta 5.9789 mg de AA por cada 100 ml, mientras que en el presente estudio se encontró que 100 ml de CH contenían 232.8671 mg de AA.

La caracterización de los nutrientes presentes en el CH preparado a partir de fémur de ganado bovino reveló que el principal aporte nutricional del CH se debe a el contenido de proteína presente en él, debido a que el valor nutricional una proteína está determinada por la cantidad de AA que aporta, en especial de aquellos conocidos como AAE (Chimegee & Dashmaa, 2018).

Los AAE son aquellos que el organismo no puede sintetizar por sí mismo, pero al ser componentes de las proteínas, son esenciales para el buen funcionamiento del organismo, además de presentar una función anti-inflamatoria (Vidal-Lletjós et al., 2017), la obtención de estos aminoácidos se hace a través de la dieta. Se demostró que el CH es un alimento de gran valor nutricional, debido a que el 54.56% de los AA presentes en el CH son considerados del tipo esencial, estos resultados pueden ser atribuidos al tipo de hueso utilizado, en este caso el fémur el cual contiene una gran proporción de medula ósea (Adeyeye, 2014).

Ciertos aminoácidos son considerados biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con CU, como Gln, Glu, Met, Trp e His, los cuales son significativamente más bajos en pacientes con CU que en personas sanas (He et al., 2018). La caracterización de los AA presentes en el CH reveló que el 21.53 % corresponde a Glu y el 18.89 % a His, siendo estos los AA encontrados en mayor proporción en el CH, Con lo cual se puede inferir que el consumo de CH podría ayudar al aumento y mantenimiento de los niveles de Glu e His, mediante la determinación de una dosis de CH que sea capaz de cubrir los requerimientos necesarios de estos AA.

Además, se ha reportado que la Glu es capaz de aumentar significativamente la proliferación celular, disminuir la apoptosis y la inflamación en la mucosa del colon, aunado a la reducción de la evidencia histopatológica de las lesiones características de la CU (Bao et al., 2017), mientras que la His es capaz de reducir los niveles de expresión de

Tnf- α e *Il-6* (Farshid et al., 2009). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos, la administración profiláctica de CH disminuyó el daño histológico causado por la inoculación intrarectal de TNBS y AcOH, pudiendo inferir que los resultados obtenidos son atribuibles a el consumo de estos AA, ya que estos corresponden al 40.42% del total de AA presentes en el CH.

Una de las ventajas del CH y posible perspectiva a futuro, es el realizar un ajuste en el consumo de este alimento, de manera que se puedan proporcionar las cantidades necesarias de AA que lleven a la completa recuperación de la mucosa del colon. El principal reto radica en que alimentos de origen natural a los que se le atribuyen efectos terapéuticos llegan a ser consumidos en grandes proporciones con la idea de que a mayor consumo mayor será su efecto, lo cual es erróneo ya que tanto la deficiencia como el consumo excesivo genera riesgos a la salud (Roncancio & Latorre, 2015).

Entre los nutrientes encontrados en el CH se encuentran los minerales, algunos estudios han demostrado que los niveles de Ca y Mg están asociados con el tiempo de cocción, sin embargo, no se ha estudiado si el prolongado tiempo de cocción establecido para la elaboración del CH representa un riesgo para el aumento de los niveles de minerales que pueden generar efectos adversos para la salud si se consumen en grandes cantidades (Hsu et al., 2017). En el presente estudio se pudo descartar que el consumo de CH pueda representar un riesgo para la salud, dichos resultados concuerdan con lo reportado por Hsu et al., (2017). La ingesta diaria de minerales recomendada es de 8241 mg (Chimegee & Dashmaa, 2018; Hsu et al., 2017), el consumo de una porción de 100 ml de CH aporta 0.30 % de la cantidad de minerales que deben de ser consumidos diariamente.

Entre los principales minerales encontrados en el CH se observó que el 50.3' % correspondía a Na, seguido del Ca con un 25.64%. Aunque el principal aporte de minerales del CH sea Na este no representa un riesgo a la salud ya que en términos generales una dosis de 100 ml de CH aportaría el 0.62% de la ingesta diaria recomendada de Na (2000 mg) (Hsu et al., 2017).

Por otro lado, el desconocer los mecanismos que llevan al desarrollo de la enfermedad dificulta el desarrollo de tratamientos que sean efectivos para combatir la

enfermedad (Munyaka et al., 2016), pero además a consecuencia de esto no existen marcadores diagnósticos que respalden al 100% la efectividad de los tratamientos (Conrad et al., 2014). El diagnóstico de esta enfermedad se basa en los hallazgos endoscópicos e histológicos (Van Assche et al., 2010). Los resultados obtenidos indican que el CH es capaz de reducir el daño histológico causado por la administración intrarectal de TNBS y AcOH. Aunque el tratamiento lleve a la curación de la mucosa, puede existir prevalencia de actividad histológica cercana al 30% (González-Partida, 2018). Por ello, los resultados obtenidos del análisis histológico no son capaces de revelar si el CH es realmente efectivo para el tratamiento de la CU y fue necesario complementarlo con un perfil de citocinas. Se determinó el perfil de citocinas mediante qPCR debido a que esta técnica tiene mayor grado de sensibilidad a diferencia de otras técnicas, como ELISA (Amsen et al., 2009).

Se ha identificado que la inflamación del colon en la CU es causada principalmente por el aumento de la expresión de *Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf- α* e *Inf- γ* (Filipescu et al., 2018). La inducción de CU a partir de la administración intrarectal de TNBS y AcOH produce un aumento significativo en los niveles de expresión de dichas citocinas, en cambio la administración profiláctica de CH previo a la inducción de CU dio como resultado una disminución de la expresión de *Il-1 β* , *Il-6* y *Tnf- α* . Lo cual nos indica que el efecto anti-inflamatorio del CH se debe a que es capaz de disminuir la expresión de las principales citocinas implicadas en el desarrollo de la enfermedad.

Uno de los resultados más relevantes del presente trabajo es que el CH aumento la expresión de *Inf- γ* , a pesar de que es considerada una citocina pro-inflamatoria, también es capaz de aumentar la actividad microbicida de los macrófagos (García-Hernández et al., 2009), lo cual podría explicar el aumento en la expresión de *Inf- γ* , infiriendo que el CH estimula su expresión con el propósito de aumentar la respuesta inmune y protectora contra agentes extraños. Por otro lado, en algunas enfermedades se han identificado que algunas células tipo Th1 productoras de *Inf- γ* , que también son capaces de producir *Il-10* (Trinchieri, 2001), la expresión de estas dos citocinas podría tener un efecto cooperativo en la reducción de los niveles de expresión de *Tnf- α* , tal y como se observó en el trabajo realizado por Yanagawa et al., (2009). Actualmente no han sido dilucidados los mecanismos que llevan a la producción conjunta de estas citocinas.

Otro de los factores asociados a la severidad y progresión de la enfermedad es la desregulación de la respuesta inmune (Tatiya-aphiradee et al., 2018), se ha observado una inhibición de los mecanismos anti-inflamatorios, como lo es la secreción de las citocinas: *Il-4* e *Il-10* (Xiong et al., 2013). Los resultados obtenidos sugieren que el CH es capaz de promover la expresión de estas citocinas. Estudios previos han reportado que terapias promueven el aumento de los niveles de *Il-10* son capaces de disminuir el daño observado en la CU, incluso de revertir este daño por completo (Lindsay et al., 2002). En contraste, observamos que el papel de la *Il-4* es controversial, debido al efecto pleiotrópico que esta interleucina tiene (Stevceva et al., 2001). Sin embargo, un trabajo realizado por Xiong et al., (2013) demostró que la terapia génica basada en *Il-4*, *Il-10* o la combinación de estas reduce el daño causado por la administración intrarectal de TNBS. Lo cual permite inferir que el efecto terapéutico del CH se debe a su capacidad de inmunomoduladora al aumentar la expresión de citocinas anti-inflamatorias y reducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias.

Los resultados encontrados representan la primera evidencia científica del efecto terapéutico del caldo de hueso frente a la CU, estudios posteriores permitirán delimitar si el consumo de CH podría ser una alternativa natural y de bajo costo con resultados tan efectivos como los obtenidos mediante terapia génica.

9. CONCLUSIONES

1. El CH es una fuente rica en nutrientes, donde predomina la presencia de aminoácidos esenciales.
2. El consumo de CH como tratamiento profiláctico modula la respuesta inmunológica generada por la administración intrarectal de TNSB y AcOH en ratones BALB/c reduciendo el daño morfológico, disminuyendo de manera significativa la expresión de citocinas pro-inflamatorias y estimulando la expresión de citocinas anti-inflamatorias.
3. Se propone el CH como una terapia alternativa para el tratamiento de la CU.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adeyeye EI. 2014. Bone marrow: a source of nutritionally valuable fats as typified in the femur of ram and bull. *Open Journal of Analytical Chemistry Research*, 2(1):1-15.
- Afolayan RA, Deland MPB, Rutley DL, Bottema CDK, Ewers AL, Ponzoni RW, & Pitchford WS. 2002. Prediction of carcass meat, fat and bone yield across diverse cattle genotype using live-animal measurements. *Animal Production in Australia*, 24:13-16.
- Alcock RD, Shaw GC, & Burke LM. 2019. Bone Broth Unlikely to Provide Reliable Concentrations of Collagen Precursors Compared with Supplemental Sources of Collagen Used in Collagen Research. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 29(3):265-272.
- Alok PC. 2013. Effect of Coconut Oil on Ulcerative Colitis in the Mouse Model (Master Theses). Western Kentucky University, United States.
- Amsen D, de Visser KE, & Town T. 2009. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 511, 107–142.
- Ananthakrishnan AN. 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(4):205.
- Bao X, Feng Z, Yao J, Li T, & Yin Y. 2017. Roles of dietary amino acids and their metabolites in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators of inflammation*, 2017(2017):6869259.
- Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, & Wajda A. 2001. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 91(4):854-862.
- Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, ... & Blanchard JF. 2006. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(7):1559.

- Bertrand J, Goichon A, Déchelotte P, & Coëffier M. 2013. Regulation of intestinal protein metabolism by amino acids. *Amino acids*, 45(3): 443-450.
- Blanco-Rodríguez M. 2014. Evolución y complicaciones de los niños tratados con trasplante de progenitores hematopoyéticos y su relación con el estado nutricional y soporte empleado (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Bolant B, Calvo MA, Cejalvo D, Gimeno LO, Gimeno L, & Lloris JM. 1990. La eutanasia en los animales de laboratorio. Centro de investigación. Hospital General Universitario de Valencia. *Research in Surgery*, 5:45-56.
- Bueno-Hernández N, Núñez-Aldana M, Ascaño-Gutiérrez I, & Yamamoto-Furusho JK. 2015. Evaluation of diet pattern related to the symptoms of mexican patients with Ulcerative Colitis (UC): through the validity of a questionnaire. *Nutrition Journal*, 14(1):25.
- Calvet X, Argüelles-Arias F, López-Sanromán A, Cea-Calvo L, Juliá B, de Santos CR., & Carpio D. 2018. Patients' perceptions of the impact of ulcerative colitis on social and professional life: results from the UC-LIFE survey of outpatient clinics in Spain. *Patient Preference and Adherence*, 12:1815-1823.
- Campbell-McBride N. 2008. Gut and psychology syndrome. *Journal of Orthomolecular Medicine*, 23(2):90-94.
- Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kantarceken B, Ciralik H, Kurutas EB, Buyukbese MA, & Gumusalan Y. 2006. Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acetic acid-induced colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 51(3):488-494.
- Cheng H, Xia B, Zhang L, Zhou F, Zhang YX, Ye M, ... & Li C. 2006. Matrine improves 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Pharmacological Research*, 53(3):202-208.
- Chimegee N, & Dashmaa D. 2018. The daily value of micronutrients in newly produced beef and horse concentrated bone broths. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, 23(01):30-34.

- Choi HG, Choi HS, Choi YS, Jung MO, Choi JS, & Choi YI. 2016. Effects of mixed bone and brisket meat on physico-chemical characteristics of shank bone and rib extracts from Hanwoo. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(1):61-67.
- Choi JS, Jin SK, Choi YS, Lee JK, Jung JT, Choi YI, ... & Lee JJ. 2017. Effect of calcium lactate on physico-chemical characteristics of shank bone extract. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(2):313-319.
- Chotechuang N, Lokkhumlue M, & Deetae P. 2018. Effect of Temperature and Time on Free amino acid profile in Thai chicken bone soup stock preparation. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*, 42(3):110-117.
- Conrad K, Roggenbuck D, & Laass MW. 2014. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmunity Reviews*, 13(4-5):463-466.
- Coward S, Heitman SJ, Clement F, Hubbard J, Proulx MC, Zimmer S, ... & Ghosh S. 2015. Ulcerative colitis-associated hospitalization costs: a population-based study. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 29(7):357-362.
- Cucino C, & Sonnenberg A. 2001. Cause of death in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 7(3):250-255.
- Dolz C. 2008. Terapéutica biológica en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerosa. *Medicina Balear*, 23(3):19-23.
- Elia M, Normand C, Laviano A, & Norman K. 2016. A systematic review of the cost and cost effectiveness of using standard oral nutritional supplements in community and care home settings. *Clinical Nutrition*, 35(1):125-137.
- Etheridge RD, Pesti GM, & Foster EH. 1998. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology*, 73(1-2):21-28.

- Farshid AA, Tamaddonfard E, Belasius MS, & Hamzeh-Gooshchi N. 2009. Histopathological comparison of the effects of histidine and ketotifen in a rat model of colitis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53(4):795-800.
- Feldman DB, & Gupta BN. 1976. Histopathologic changes in laboratory animals resulting from various methods of euthanasia. *Laboratory Animal Science*, 26(2 Pt 1):218-221.
- Feuerstein JD, & Cheifetz AS. 2014. Ulcerative colitis: epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(11):1553-1563.
- Filipescu IE, Leonardi L, Menchetti L, Guelfi G, Traina G, Casagrande-Proietti P, ... & Brecchia G. 2018. Preventive effects of bovine colostrum supplementation in TNBS-induced colitis in mice. *PLOS ONE*, 13(8):e0202929.
- García-Hernández M, Guerrero-Ramírez G, Castro-Corona, MDLÁ, & Medina-de-la Garza, CE. 2009. Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Medicina Universitaria*, 11(45):247-259.
- Geerling BJ, Badart-Smook A, Stockbrügger RW, & Brummer RJ. 1998. Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5):919-926.
- Gonzales-Partida I. 2018. Evaluación histológica en pacientes con colitis ulcerosa en remisión endoscópica (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Górska-Warsewicz H, Laskowski W, Kulykovets O, Kudlińska-Chylak A, Czeczotko M, & Rejman K. 2018. Food Products as Sources of Protein and Amino Acids—The Case of Poland. *Nutrients*, 10(12):1977.
- Haskey N, & Gibson D. 2017. An examination of diet for the maintenance of remission in inflammatory bowel disease. *Nutrients*, 9(3):259-279.
- Hassan AA, Sandanger TM, & Brustad M. 2012. Level of selected nutrients in meat, liver, tallow and bone marrow from semi-domesticated reindeer (*Rangifer t. tarandus L.*). *International Journal of Circumpolar Health*, 71(1):17997.

- He F, Wu C, Li P, Li N, Zhang D, Zhu Q, ... & Peng Y. 2018. Functions and signaling pathways of amino acids in intestinal inflammation. *BioMed Research International*, 2018(3):1–13.
- Head KA, & Jurenka JS. 2003. Inflammatory Bowel Disease Part 1: Ulcerative Colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 8(3):247-283.
- Hiraoka S, Kato J, Suzuki H, & Yamamoto K. 2012. Readministration of calcineurin inhibitors for ulcerative colitis. *Annals of Pharmacotherapy*, 46(10):1315-1321.
- Hsu DJ, Lee CW, Tsai WC, & Chien YC. 2017. Essential and toxic metals in animal bone broths. *Food & Nutrition Research*, 61(1):1347478.
- Iacucci M, & Ghosh S. 2011. Looking beyond symptom relief: evolution of mucosal healing in inflammatory bowel disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 4(2):129-143.
- Jonas CR, & Ziegler TR. 1999. Potential role of glutamine administration in inflammatory bowel disease. In *Nestle Nutrition Workshop Series. Clinical & Performance Programme*, 2:217-230.
- Kim D, Kim HJ, Chae HS, Park NG, Kim YB, & Jang A. 2014. Anti-oxidation and anti-wrinkling effects of Jeju horse leg bone hydrolysates. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(6):844-851.
- Kim HJ, Kim D, Chae HS, Kim NY, & Jang A. 2017. Nutritional Composition in Bone Extracts from Jeju Crossbred Horses at Different Slaughter Ages. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(4):486-493.
- Kirsner JB. 2001. Historical origins of current IBD concepts. *World Journal of Gastroenterology*, 7(2):175-184.
- Lindsay J, Van Montfrans C, Brennan F, Van Deventer S, Drilenburg P, Hodgson H, ... & Pena MSR. 2002. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene therapy*, 9(24):1715-1721.

- Liu Y, Wang X, & Hu CA. 2017. Therapeutic potential of amino acids in inflammatory bowel disease. *Nutrients*, 9(9):920-937.
- Lynch WD, & Hsu R. 2018. Colitis Ulcerative. StatPearls Publishing, Treasure Island.
- Malmberg P, & Nygren H. 2008. Methods for the analysis of the composition of bone tissue, with a focus on imaging mass spectrometry (TOF-SIMS). *Proteomics*, 8(18):3755-3762.
- Méndez RO, Bueno K, Campos N, López D, Wyatt CJ, & Ortega MI. 2005. Contenido total y disponibilidad in vitro de hierro y zinc en alimentos de mayor consumo en Sonora y Oaxaca, México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55(2):187-193.
- Mizokami A, Wang D, Tanaka M, Gao J, Takeuchi H, Matsui T, & Hirata M. 2016. An extract from pork bones containing osteocalcin improves glucose metabolism in mice by oral administration. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(11):2176-2183.
- Monro JA, Leon R, & Puri BK. 2013. The risk of lead contamination in bone broth diets. *Medical Hypotheses*, 80(4):389-390.
- Munyaka PM, Rabbi MF, Khafipour E, & Ghia JE. 2016. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *Journal of Basic Microbiology*, 56(9):986-998.
- Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, ... & Sung JJ. 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114):2769-2778.
- Nivin-Huerta J, Carbajal-Urteaga P, Aceituno-Llana L, & Moras-Rosado M. 2013. Efecto preventivo de la *Tabebuia serratifolia* (palo de arco) en un modelo murino de colitis aguda inducida con ácido acético en ratones BALB-c machos. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 18(1):19-22.

- Null KD, Xu Y, Pasquale MK, Su C, Marren A, Harnett J, ... & Healey P. 2017. Ulcerative colitis treatment patterns and cost of care. *Value in Health*, 20(6):752-761.
- Papi C, Fasci-Spurio F, Rogai F, Settesoldi A, Margagnoni G, & Annese V. 2013. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: treatment efficacy and predictive factors. *Digestive and Liver Disease*, 45(12):978-985.
- Prelipcean CC, Mihai C, Gogalniceanu P, Mihai B. 2013. What is the impact of age on adult patients with inflammatory Bowel Disease?. *Clujul Medical*, 86(1):3-9.
- Ramos-Carrillo NF. 2010. Aprovechamiento del desecho de huesos de res para la obtención de harina de hueso en la fábrica Federer (Tesis de Licenciatura). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Rennard BO, Ertl RF, Gossman GL, Robbins RA, & Rennard SI. 2000. Chicken soup inhibits neutrophil chemotaxis in vitro. *Chest*, 118(4):1150-1157.
- Roberts-Thomson IC, Bryant RV, & Costello SP. 2019. Uncovering the cause of ulcerative colitis. *JGH Open: An Open Access Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 3(4):274-276.
- Roncancio JJB, & Latorre LMS. 2015. Algunos peligros químicos y nutricionales del consumo de los alimentos de venta en espacios públicos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 47(3):349-360.
- Rubin DT, Dubinsky MC, Panaccione R, Siegel CA, Binion DG, Kane SV, & Hopper J. 2010. The impact of ulcerative colitis on patients' lives compared to other chronic diseases: a patient survey. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(4):1044-1052.
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, ... & De Villiers WJ. 2005. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine*, 353(23):2462-2476.
- Salice M, Rizzello F, Calabrese C, Calandrini L, & Gionchetti P. 2019. A current overview of corticosteroid use in active ulcerative colitis. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 13(6):557-561.

- Sánchez-Calvo JM. 2013. Análisis metagenómico de la microbiota intestinal en pacientes con colitis ulcerosa (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Sehgal P, Colombel JF, Aboubakr A, & Narula N. 2018. Systematic review: safety of mesalazine in ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 47(12):1597-1609.
- Seol JY, Yoon JY, Jeong HS, Joo N, & Choi SY. 2016. Anti-Aging Effects of the Hanwoo Leg Bone, Foot and Tail Infusions (HLI, HFI and HTI) on Skin Fibroblast. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(2):237-243.
- Sepúlveda SE, Beltrán CJ, Peralta A, Rivas P, Rojas N, Figueroa C, ... & Hermoso MA. 2008. Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica. *Revista Médica de Chile*, 136(3):367-375.
- Shi XZ, Winston JH, & Sarna SK. 2010. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(1):G41-G51.
- Shlisky J, Bloom DE, Beaudreault AR, Tucker KL, Keller HH., Freund-Levi Y, ... & Meydani SN. 2017. Nutritional considerations for healthy aging and reduction in age-related chronic disease. *Advances in Nutrition*, 8(1),17-26.
- Stevceva L, Pavli P, Husband A, Ramsay A, & Doe WF. 2001. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. *Genes & Immunity*, 2(6):309-316.
- Tatiya-aphiradee, N., Chatuphonprasert, W., & Jarukamjorn, K. 2018. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 30(1):1-10.
- Tian Z, Liu J, Liao M, Li W, Zou J, Han X, ... & Li H. 2016. Beneficial effects of fecal microbiota transplantation on ulcerative colitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(8):2262-2271.

- Tomasello G, Sinagra E, Raimondo D, Palumbo VD, Puleio R, Cottone M, ... & Buscemi S. 2015. Validation of a modified model of TNBS-induced colitis in rats. How to induce a chemical colitis in rats. *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis*, 86(1):92-96.
- Trinchieri G. 2001. Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(10):F53–F57.
- Tsune I, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Takei Y, & Sato N. 2003. Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat. *Gastroenterology*, 125(3):775-785.
- USDA-FAS. 2016. Mexico Livestock and Products Semi-annual Report. Disponible en <https://www.fas.usda.gov/data/mexico-livestock-and-products-semi-annual-0>
- Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, ... & Kupcinkas L. 2010. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 4(1):7-27.
- Vidal-Lletjós S, Beaumont M, Tomé D, Benamouzig R, Blachier F, & Lan A. 2017. Dietary protein and amino acid supplementation in inflammatory bowel disease course: What impact on the colonic mucosa? *Nutrients*, 9(3): 310-316.
- Wang WW, Qiao SY, & Li DF. 2009. Amino acids and gut function. *Amino acids*, 37(1):105-110.
- Weiss CR, Guan Q, Ma Y, Qing G, Bernstein CN, Warrington RJ, & Peng Z. 2015. The potential protective role of caveolin-1 in intestinal inflammation in TNBS-induced murine colitis. *PLOS ONE*, 10(3):e0119004.
- Xavier RJ, & Podolsky DK. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152):427-434.

- Xiong J, Lin YH, Bi LH, Wang JD, Bai Y, & Liu SD. 2013. Effects of interleukin-4 or interleukin-10 gene therapy on trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis. *BMC gastroenterology*, 13(1):165.
- Xiong J, Lin YH, Bi LH, Wang JD, Bai Y, & Liu SD. 2013. Effects of interleukin-4 or interleukin-10 gene therapy on trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis. *BMC gastroenterology*, 13(1):165.
- Xu Q, Ming Z, Dart AM, & Du XJ. 2007. Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(5-6):499-507.
- Yamamoto-Furusho JK. 2009. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico: a single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43(3):221-224.
- Yanagawa Y, Iwabuchi K, & Onoé K. 2009. Co-operative action of interleukin-10 and interferon-gamma to regulate dendritic cell functions. *Immunology*, 127(3):345–353.
- Zhang H, Hu CAA, Kovacs-Nolan J, & Mine Y. 2015. Bioactive dietary peptides and amino acids in inflammatory bowel disease. *Amino Acids*, 47(10):2127-2141.

11. ANEXOS

11.1. Dictamen del Comité Interno de Bienestar Animal en la Enseñanza e Investigación (CIBAEI).

DICTAMEN 01/2019

Título: "Análisis de la capacidad regenerativa y antiinflamatoria del caldo de hueso en un modelo murino de colitis ulcerativa".

Responsable: Dr. Uziel Castillo Velázquez.

Estudiante de Posgrado: LGB. Laura Marisol Mar Solís.


Comentarios: El proyecto justifica el bienestar de los ratones.

Dictamen: Se aprueba el Proyecto.

ATENTAMENTE

Escobedo, N. L. a 19 Marzo del 2019

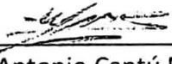
Comité Interno de Bienestar Animal en la Enseñanza e Investigación:




PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar



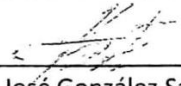
MC. Jorge Arcadio Martínez Salazar



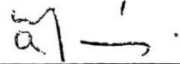
Dr. Marco Antonio Cantú Martínez



MC. Andrea González Báez



Dr. José González Salinas



Dra. Alicia Magdalena Nevárez Garza

11.2. Dictamen del Comité de Bioseguridad e Higiene (CBSH) de la FMVZ.

DICTAMEN REVISIÓN PROYECTO/INVESTIGACIÓN/PRÁCTICA

Comité de Bioseguridad e Higiene

Título (proyecto investigación/ práctica):	"Análisis de la capacidad regenerativa y anti-inflamatoria del caldo de hueso en un modelo murino de colitis ulcerativa"	ID CSBH: 006
Investigador Principal	Dr. Uziel Castillo Velázquez	
Dictamen:	APROBADO	Fecha dictamen: 12 Sept 2018
Observaciones/Modificaciones:	Se realizaron los cambios.	

Nombre y firma recibida:

Sello CBSH



Laura Marisol Mar Solís

Miembros del Comité de Bioseguridad e Higiene

Julio C. Cruz Valdéz

Óscar D. García Pérez

Alicia G. Marroquín Cardona

José González Salinas

Rodrigo Hernández Santiago

Karina W. Vazquez Cisneros

KARINA W. VAZQUEZ CISNEROS

Dictamen Comité de Bioseguridad e Higiene

FMVZ UANL

Página: 1

11.3. Técnica Histológica: Procesamiento de muestras.

Una vez extraídos los tejidos estos fueron lavados con NaCl 0.9%, para después ser fijados en PFA 4% durante 48 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de fijación los tejidos fueron encapsulados en los cassettes de inclusión y etiquetados, luego fueron lavados en agua corriente durante 10 min para retirar el exceso de fijador y finalmente fueron enjuagados en agua destilada.

Los tejidos fueron sometidos a un proceso de deshidratación (Tabla 9) con el objetivo de puedan ser impregnados en parafina para poder hacer la inclusión de los tejidos en bloques de parafina y poder realizar cortes con un microtomo que posteriormente pasaran por un proceso de rehidratación (Tabla 10), para poder realizar la tinción.

Tabla 9. Procedimiento de deshidratación

Solución:	Tiempo de inmersión:
1. Alcohol etílico al 60%	1 h
2. Alcohol etílico al 70%	1 h
3. Alcohol etílico al 80%	1 h
4. Alcohol etílico al 96%	1 h
5. Alcohol etílico al 96%	1 h
6. Alcohol etílico absoluto	1 h
7. Alcohol etílico absoluto	1 h
8. Etanol absoluto y Xilol (1:1)	1 h
9. Xilol	1 h
10. Xilol	1 h
11. Parafina liquida	1 h
12. Parafina liquida	1 h

Tabla 10. Desparafinación e Hidratación

Solución:	Tiempo de inmersión:
1. Xilol	5 min
2. Etanol absoluto y Xilol (1:1)	5 min
3. Etanol absoluto	2 min
4. Alcohol etílico al 96%	2 min
5. Agua destilada	Enjuague lento

11.4. Tinción de Hematoxilina & Eosina.

Esta tinción se considera de contraste, por lo cual se pueden detectar alteraciones morfológicas. Se emplean dos colorantes, el primero es la hematoxilina el cual actúa como un colorante básico y tiñe de color azul-purpura el núcleo de la célula, el segundo colorante empleado es la eosina el cual es un colorante ácido que tiñe de color rosa-rojo el citoplasma, tejidos fibrosos o el fondo de los componentes tisulares (Tabla 11).

Tabla 11. Pasos para la tinción de H&E

Solución:	Tiempo de inmersión:
1. Hematoxilina	2 min
2. Agua corriente (2 lavados)	Enjuague lento
3. Alcohol ácido	1 inmersión rápida
4. Agua corriente (2 lavados)	Enjuague lento
5. Agua Amoniaca	2 inmersiones rápidas
6. Agua corriente (2 lavados)	Enjuague lento
7. Agua destilada	Enjuague lento
8. Eosina	6 inmersiones
9. Alcohol al 96%	Enjuague breve
10. Alcohol al 96%	1 min
11. Etanol absoluto	2 min
12. Etanol absoluto	2 min
13. Etanol absoluto y Xilol (1:1)	3 min
14. Xilol	2 min
15. Xilol	3 min

11.4.1. Reactivos utilizados en la tinción de H&E.

- Hematoxilina de Gill.

La solución colorante se prepara en el orden en que se encuentran enlistados los reactivos (Tabla 12), los reactivos serán homogenizados con ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente. Una vez que se obtiene una mezcla homogénea la solución debe ser filtrada antes de ser usada.

Tabla 12. Preparación Hematoxilina de Gill

Reactivo:	Cantidad:
Agua destilada	730 ml
Etilenglicol	250 ml
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 g
Yodato de sodio	0.2 g
Sulfato de aluminio	17.6 g
Ácido acético glacial	2 ml

- Eosina.

La eosina es preparada a partir de una solución stock (Tabla 13). La solución de trabajo es preparada diluyendo una parte de la solución stock en tres partes de alcohol al 80% (1:3). Por cada 100 ml de colorante preparado se agregarán 0.5 ml de ácido glacial.

Tabla 13. Preparación de la solución stock de Eosina.

Reactivo:	Cantidad:
Eosina amarillenta	1 g
Agua destilada	20 ml
Alcohol al 96%	80 ml

- Solución de Alcohol-Ácido.

Tabla 14. Preparación de la solución de alcohol-ácido.

Reactivo:	Cantidad:
Alcohol al 70%	99 ml
Ácido clorhídrico concentrado	1 ml

- Solución de Agua Amoniacal.

Tabla 15. Preparación de la solución de agua amoniacal.

Reactivo:	Cantidad:
Agua destilada	99 ml
Hidróxido de Amonio	1 ml

11.5. Tinción de Ácido Peryódico de Schiff.

La tinción de PAS es una técnica histoquímica utilizada para la identificación de componentes celulares ricos en hidratos de carbono, los cuales serán observados de color rosa o violeta-púrpura.

Tabla 16. Pasos para la tinción de PAS

Solución:	Tiempo de inmersión:
1. Ácido peryódico al 0.5%	7 min
2. Agua destilada	Enjuague lento
3. Reactivo de Schiff	20 min
4. Solución enjuagadura sulfurosa	2 min
5. Solución enjuagadura sulfurosa	2 min
6. Agua corriente (2 lavados)	Enjuague lento
7. Agua destilada	Enjuague lento
8. Hematoxilina de Gill	2 min
9. Agua corriente	Enjuague lento
10. Alcohol ácido	Enjuague breve
11. Agua amoniacal	Enjuague breve
12. Agua corriente	Enjuague lento
13. Agua destilada	Enjuague lento
14. Alcohol al 96%	Enjuague breve
15. Alcohol al 96%	1 min
16. Etanol absoluto	2 min
17. Etanol absoluto	2 min
18. Etanol absoluto y Xilol (1:1)	3 min
19. Xilol	2 min
20. Xilol	3 min

11.5.1. Reactivos utilizados en la tinción de PAS.

- Solución acuosa de Ac. Peryódico al 0.5%.

Tabla 17. Preparación de la solución acuosa de Ac. Peryódico al 0.5%.

Reactivo:	Cantidad:
Ac. Peryódico (cristales)	0.5 g
Agua destilada	100 ml

- Solución Enjuagadura Sulfurosa.

Tabla 18. Preparación de la solución enjuagadura sulfurosa.

Reactivo:	Cantidad:
Agua destilada	300 ml
Ac. Clorhídrico 1N	15 ml
Metabisulfito de Sodio al 10%	18 ml

- Solución de metabisulfito de sodio al 10%.

Tabla 19. Preparación de la solución de metabisulfito de sodio.

Reactivo:	Cantidad:
Metabisulfito de sodio	10 g
Agua destilada	100 ml

- Solución de Ac. Clorhídrico al 1N.

Tabla 20. Preparación de la solución de Ac. Clorhídrico al 1N.

Reactivo:	Cantidad:
Ac. Clorhídrico	8.35 ml
Agua destilada	91.65 ml